

Charakterisierung des HER2-Signalwegs im Vergleich von 2D- und 3D-Zellkultur und in einer Trastuzumab resistenten SKBR-3-Zelllinie

Dissertation der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Marlene Pickl

Januar 2009

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Penzberg, den _____

Promotionsgesuch eingereicht am: 02.02.2009

Tag der mündl. Prüfung: 10.08.2009

Erste Gutachterin:

PD Dr. Angelika Böttger

Zweite Gutachterin:

Prof. Dr. Elisabeth Weiss

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Mai 2005 und Januar 2009 unter Anleitung von Dr. Carola Ries in der Abteilung Onkologie/Zellbiologie der Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation veröffentlicht:

Pickl M. und Ries C.H. (2009). Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*, 28(3):461-8.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Tumorentstehung und –progression.....	3
2.2 in vitro Tumormodelle	5
2.2.1 Dreidimensionale, multizelluläre Zellkulturmodelle	6
2.2.2 Methoden zur Herstellung von 3D-Kulturen <i>in vitro</i>	7
2.2.3 Die biologische Bedeutung der 3D-Zellmodelle	8
2.3 Die Rezeptortyrosinkinase HER2 – ein Protoonkogen.....	9
2.3.1 HER2-vermittelte Onkogenese und Signaltransduktion	11
2.3.2 Regulation der HER2-Aktivierung durch subzelluläre Lokalisation.....	14
2.3.3 Die spezifische Inhibition von HER2 mittels Trastuzumab	15
2.3.3.1 Wirkmechanismen von Trastuzumab	15
2.3.3.2 Potentielle Resistenzmechanismen gegen Trastuzumab.....	17
2.4 Zielsetzung der Arbeit.....	18
3 Ergebnisse.....	20
3.1 Charakterisierung von Tumorzellen in 2D- und 3D-Zellkultur	20
3.1.1 Etablieren des SKBR-3 Spheroidmodels	20
3.1.1.1 SKBR-3 Zellen proliferieren in 3D-Kultur	20
3.1.1.2 Keine Induktion von Nekrose im Inneren der Zellaggregate.....	21
3.1.2 Trastuzumab inhibiert die Zellproliferation bei SKBR-3 und SKOV-3 in 3D- Kultur	22
3.1.3 Unterschiedliche Signalwegaktivierung in 3D-Kultur.....	25
3.1.3.1 Induktion der HER2-Phosphorylierung und Änderung der assoziierten Signalwege in 3D-Kultur	25
3.1.3.2 Aktivierung von Integrin $\beta 4$ und Rac1/PAK2 in 3D-Kultur	27
3.1.3.3 Verringerte Assoziation von HER2/HER3-Heterodimeren und unterschiedliche Rekrutierung von Adapterproteinen in 3D	29
3.1.4 Lokalisation von HER2 in GM1-angereicherten Lipiddomänen in 3D.....	31
3.1.5 Genexpressionsanalyse von SKBR-3 in 2D- und 3D-Kultur	33

3.1.6 Die Expression von Caveolin-1 ist bei SKBR-3 in 3D-Kultur herunterreguliert	34
3.1.6.1 Vergleich der Caveolin-1 Expression in verschiedenen Krebszelllinien..	36
3.1.6.2 Die transiente Expression von Caveolin-1 in SKBr3 hemmt die Zellaggregation in 3D-Kultur	37
3.1.6.4 Die Inhibition der Gangliosid-Biosynthese interferiert mit der Phosphorylierung von HER2 in 3D-Kultur	38
3.1.7 Vergleich der HER-Proteinkomplexe in 2D- und 3D-Kultur	40
3.2 Generierung und Charakterisierung einer Trastuzumab resistenten SKBR-3 Linie in vitro	42
3.2.1 Generierung einer Trastuzumab resistenten SKBR-3 Linie in vitro.....	42
3.2.1.1 Selektion der Trastuzumab resistenten SKBR-3 Zellen in 3D-Kultur.....	42
3.2.1.2 Induktion einer reversiblen Trastuzumab Resistenz in 3D-Kultur	44
3.2.2 Charakterisierung der Trastuzumab resistenten Zelllinie SKBR-3 HR	45
3.2.2.1 Zunahme der HER2-Oberflächenexpression bei SKBR-3 HR	45
3.2.2.2 Genexpressionsanalyse von SKBR-3 HR und SKBR-3 in 3D-Kultur	47
3.2.2.3 Identifizierung von DARPP-32 als potentiellen Resistenzmarker.....	48
3.2.2.4 Überprüfung der DARPP-32 Expression und Lokalisation.....	50
3.2.2.5 Aktivierung von HER2 und HER3 in Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR und Zunahme der Akt-Kinase-Phosphorylierung.....	52
3.2.2.6 Die Zunahme der HER2/HER3-Heterodimere in Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR führt zur Rekrutierung von PI3K.....	55
3.2.3 Untersuchung der DARPP-32 Proteinexpression in humanen Tumorproben .	57
3.2.3.1 DARPP-32 wird in humanen, HER2-positiven Tumoren exprimiert	57
3.2.3.2 Nachweis von DARPP-32 in mit Chemotherapeutika behandelten humanen Tumorproben	59
3.2.4 Die Überexpression von DARPP-32 und t-DARPP in SKBR-3 beeinflussen nicht die Inhibition der Zellproliferation durch Trastuzumab	60
3.2.5 Der duale Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib inhibiert die Proliferation der	63
Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR	63
4 Diskussion	65
4.1 dreidimensionale Zellkultur als verbessertes in vitro Tumormodell	65

4.2 Die Aktivierung von HER2-Homodimeren wird in 3D-Kultur begünstigt	66
4.3 Die Bedeutung von Integrin $\beta 4$ und Rac1/PAK2 in 3D-Kultur	68
4.4 Ist eine Reorganisation der Zelloberfläche in 3D-Kultur der Schlüssel für eine Zunahme der HER2-Aktivierung?	70
4.5 Die Rolle von DARPP-32 und t-DARPP bei der Resistenzentwicklung gegen Trastuzumab.....	73
4.6 HER3 als Hauptmediator der Trastuzumab Resistenz.....	75
4.7 Genexpressionsprofile spiegeln Komplexität der Trastuzumab-Resistenz wider ..	76
5 Ausblick	77
6 Materialien und Methoden.....	79
6.1 Materialien	79
6.1.1 Geräte.....	79
6.1.2 Reagenzien.....	79
6.1.3 Standardpuffer.....	81
6.1.4 Antikörper	83
6.1.5 Oligonukleotide.....	84
6.1.6 Zelllinien	84
6.1.7 Zellkulturbedarf	85
6.1.9 Hard- und Software.....	86
6.2 Methoden	86
6.2.1 Zellbiologische Methoden	86
6.2.1.1 Zellkultur.....	86
6.2.1.2 Herstellung von Spheroidkulturen	86
6.2.1.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	87
6.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Generationszeit eukaryotischer Zellen	88
6.2.1.5 Bestimmung der Zellviabilität	88
6.2.1.6 Viabilitätsanalyse mittels Hoechst 33342.....	88
6.2.1.7 Nachweis von nekrotischen Zellen innerhalb der Spheroide.....	89
6.2.2 Immunzytochemie.....	89
6.2.2.1 Subzelluläre Lokalisation von Proteinen	89
6.2.2.2 Färben der lipidreichen Mikrodomänen.....	89
6.2.3 Durchflusszytofluorimetrie	90

6.2.3.1 HER2-Oberflächenexpression	90
6.2.3.2 Bestimmung der GM1-Expression nach [D]-PDMP Behandlung.....	91
6.2.4 Molekularbiologische Methoden	91
6.2.4.1 RNA-Isolierung.....	91
6.2.4.1.1 Extraktion von Gesamt-RNA.....	91
6.2.4.1.2 RNA-Quantifizierung	91
6.2.4.1.3 Semiquantitative RT-PCR	92
6.2.4.2 Erstellen von Genexpressionsprofilen	93
6.2.4.3 Klonierung von pcDNA3-DARPP-32-Varianten	94
6.2.4.4 Stabile Transfektion von Plasmiden mittels Lipofektion.....	94
6.2.5 Proteinchemische Methoden.....	95
6.2.5.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellkultur	95
6.2.5.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus humanen Tumorproben	95
6.2.5.3 Gewinnung nukleärer Proteinextrakte	96
6.2.5.4 Proteinquantifizierung von Zellextrakten	97
6.2.5.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Western Blot Analyse	97
6.2.5.6 Strippen von Membranen.....	98
6.2.6 Biochemische und histopathologische Methoden.....	98
6.2.6.1 Herstellung eines linearen Sucrosegradienten	98
6.2.6.2 Hämatoxylin- und Eosinfärbung von Gewebsschnitten	99
7 Literaturverzeichnis	100
8 Abkürzungsverzeichnis	117
Danksagung	120
Lebenslauf.....	121

1 Zusammenfassung

Die Charakterisierung und Kultivierung von Tumorzelllinien mit Hilfe einer zweidimensionalen (2D) Zellkultur gilt als Standardmethode in der Zellbiologie. Dreidimensionale (3D) Modelle gewinnen jedoch immer mehr an Bedeutung, da sie die Tumorbilogie in Bezug auf physiologisch relevante Zusammenhänge bei der Tumorentstehung und –progression besser abbilden als eine herkömmliche 2D-Kultur. Die auf poly-HEMA beschichteten Zellkulturplatten induzierten multizellulären Tumorspheroide reflektieren die Morphologie von avaskularen Tumoren und Mikrometastasen. In der vorliegenden Arbeit werden anhand von HER2-überexprimierenden Tumorzelllinien die Unterschiede der HER2-Signalaktivierung und –weiterleitung in 2D- und 3D-Kultur umfassend beschrieben. In 3D-Kultur konnte ohne Zugabe von zusätzlichen Wachstumsfaktoren eine stärkere HER2-Phosphorylierung beobachtet werden. Bei der Brusttumormlinie SKBR-3 bildet HER2 in 2D-Kultur bevorzugt Heterodimere mit HER3, wohingegen in Sphroiden HER2-Homodimere vorliegen. Diese Homodimere lokalisieren in lipidreichen Mikrodomänen und begünstigen die Aktivierung des Ras-MAPK-Wegs, der die Proliferation der Tumorzellen reguliert. Mit Hilfe des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab, der spezifisch für HER2 ist, kann die Proliferation der Zellen und die Phosphorylierung von HER2 im 3D-System besser inhibiert werden. Zusätzlich konnte in 3D eine Herunterregulierung des HER2/HER3 assoziierten PI3K-Akt-Signalwegs nachgewiesen werden. Bei SKBR-3 war in 3D-Kultur neben der stärkeren Phosphorylierung von MAPK auch die Aktivierung der Integrin β 4/Rac1/PAK2-Signalkaskade zu beobachten.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit in 3D-Kultur die Zelllinie SKBR-3 HR generiert, die resistent gegen die Behandlung mit Trastuzumab ist. Die Charakterisierung dieser Linie zeigte eine verstärkte Expression von DARPP-32 und eine gesteigerte HER2/HER3-Heterodimerbildung, gefolgt von einer Hochregulierung des PI3K-Akt-Wegs. Das Gen für DARPP-32 liegt im ERBB2-Amplikon und liegt bei vielen Brusttumormproben und –zelllinien amplifiziert vor. Es konnte gezeigt werden, dass die induzierte Resistenz reversibel ist und die erneut Trastuzumab responsiven Zellen eine schwächere Expression von DARPP-32 aufwiesen, gefolgt von einer reduzierten Aktphosphorylierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass das beschriebene 3D-Modell einige *in vivo* Aspekte des HER2-Signalmusters besser reflektiert und deshalb als Basis für die weitere Aufklärung des Wirkmechanismus von Trastuzumab dienen kann. Außerdem kann dieses 3D-System zur Identifizierung von neuen Zielmolekülen herangezogen werden um Therapiestrategien zu entwickeln, welche eine Behandlung der HER2-positiven Patientenpopulation erlaubt, die bisher nur suboptimal auf die Behandlung mit Trastuzumab angesprochen haben.

2 Einleitung

Weltweit ist einer von acht Todesfällen auf die Erkrankung an Krebs zurückzuführen. In den Industriestaaten stehen Krebserkrankungen, nach Herz- und Kreislauferkrankungen, an zweiter Stelle der Todesursachen. Im Jahr 2007 schätzte man weltweit die Krebsneuerkrankungen auf ca. 12 Millionen (American Cancer Society, Atlanta, Georgia, 2007). Von den über 100 verschiedenen Krebsarten sind die häufigsten Formen Lungenkrebs, Brustkrebs, Darmkrebs und Prostatakrebs (Abb. 1).

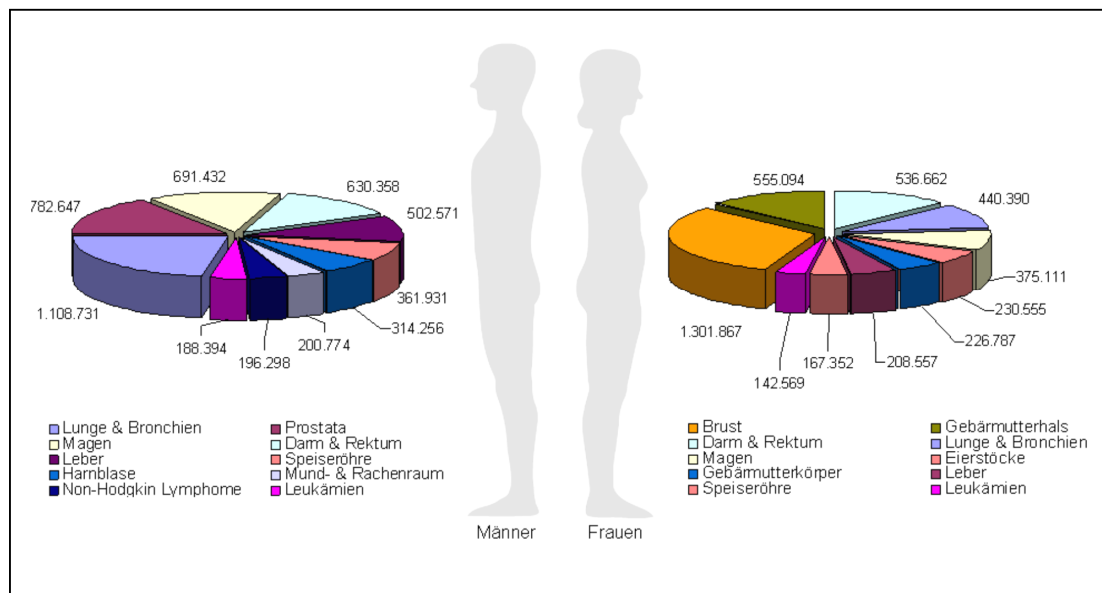


Abb. 1: Anzahl der geschätzten Krebsneuerkrankungen weltweit im Jahr 2007. Dargestellt ist die Anzahl an geschätzten Erkrankten für eine bestimmte Krebsform (aus Global Cancer Facts & Figures 2007, American Cancer Society, Atlanta, Georgia, 2008).

Es ist offensichtlich, dass es sich bei Krebs um eine äußerst heterogene Krankheit handelt (Brafford und Herlyn, 2005). Die Heterogenität spiegelt sich in der Tatsache wider, dass Tumore einer Art sich auf molekularer und genetischer Ebene unterscheiden. Beispielsweise wurden anhand von Gen- und Proteinexpressionsprofilen fünf verschiedene Subtypen für Mammakarzinome beschrieben: luminal A, luminal B, „basal-like“-Tumore, HER2-positive Karzinome und „triple negative“-Subtypen (invasives, duktales Karzinom, das weder Progesteron- noch Estrogenrezeptor exprimiert und keine HER2-Amplifikation aufweist) (Sorlie et al., 2001; Perou et al., 2000).

Wood und Kollegen verglichen unter anderem Tumorproben von mehreren Darmkrebspatienten auf Genmutationen. Die statistische Analyse ergab, dass im jeweiligen

Tumor die meisten der ca. 80 Mutationen als eher harmlos eingestuft werden könnten, wohingegen nur weniger als 15 Mutation als tatsächliche Risikofaktoren für die Entstehung und Progression eines Tumors in Frage kamen, da diese signifikant in den meisten Tumorproben nachweisbar waren (Wood et al., 2007). Es ist jedoch anzunehmen, dass jede einzelne Mutation dem Tumor einen gewissen Überlebensvorteil sichert und das Mutationsprofil eines Tumors letztendlich in seiner Gesamtheit betrachtet werden muss.

2.1 Tumorentstehung und –progression

Zellteilung, Differenzierung von Gewebetypen und Apoptose erfordern in höheren Eukaryoten präzise Regulationsmechanismen zwischen den verschiedenen Zelltypen eines Organismus. Fehlfunktionen dieses Systems aufgrund äußerer Einflüsse oder genetischer Defekte sind die Ursache einer Vielzahl von pathologischen Phänomenen, die zur Entstehung von Krebs beitragen können. Jede normale Zellteilung setzt die Replikation der DNA voraus. Statistisch gesehen beträgt die Mutationsrate in humanen somatischen Zellen 2×10^{-7} Mutationen pro Gen und Zellteilung (DeMars und Held, 1972). Ein Großteil dieser Mutationen entstehen spontan und sind auf endogene Faktoren oder Prozesse, die zur Schädigung der DNA führen können, zurückzuführen. Im Gegensatz dazu stehen exogene Faktoren, die physikalischer (z.B. Strahlung), chemischer oder biologischer Natur (z.B. onkogene Viren) sind und ebenfalls zu zellulären Störungen führen können. Häufig sind diese Veränderungen mit der konstitutiven Aktivierung von zellulären Onkogenen oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgen assoziiert, was schließlich in der Ausbildung eines Tumors resultiert (Couch, 1996). Zelluläre Onkogene entstehen durch Mutation, chromosomale Aberration oder Genamplifikation aus Protoonkogenen, die im Erbgut jeder normalen Zelle vorhanden sind und Zellteilung und Zellproliferation kontrollieren. Die Genprodukte von Onkogenen können in sechs Gruppen eingeteilt werden: Transkriptionsfaktoren (z.B. Fos, Jun, Myc), Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, TGF α), Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. EGFR, VEGFR, KIT), Chromatin modifizierende Faktoren (Histonacetylasen), Apoptoseregulatoren (z.B. Bcl-2, TNF α) und Signalweiterleitungsproteine (z.B. Akt, MAPK) (Croce, 2008; Hanahan und Weinberg, 2000).

Zu den Tumorsuppressoren zählen Proteine, die den Zellzyklus und die Apoptose regulieren und dadurch einer malignen Transformation von Zellen entgegenwirken. Damit ein Tumorsuppressor (z.B. p53, RB, PTEN) seine biologische Funktion verliert müssen beide Allele mutiert sein, wobei ein inaktiviertes Allel oft in der Keimbahn vorliegt und das zweite Allel durch somatische Mutation ausgeschaltet wird (Sherr, 2004).

Seit einiger Zeit gewinnen microRNAs in Zusammenhang mit der Tumorentstehung immer mehr an Bedeutung. MicroRNAs sind 19-25 Oligonukleotid lange RNAs, die für kein spezifisches Genprodukt kodieren. Da microRNAs negative Regulatoren der Genexpression sind, können Abweichungen in deren Expression zur Tumorgenese führen. Dies ist dann der Fall, wenn microRNAs an der posttranskriptionellen Regulation von Onkogenen oder Tumorsuppressoren beteiligt sind (Zhang et al., 2007; Lu et al., 2005). Johnson und Kollegen konnten zeigen, dass die microRNA let-7 das Onkogen Ras reguliert und dass let-7 vor allem in Lungentumoren verstärkt herunterreguliert ist. Die Inhibition der let-7 microRNA in HeLa Zellen führte zu einer gesteigerten Ras-Proteinexpression um ca. 70% (Johnson et al., 2005).

Die Tumorprogression beschreibt alle Prozesse wie Invasion und Metastasierung, die zur Bildung eines Sekundärtumors führen. Mit zunehmender Größe eines Primärtumors wird die Diffusion von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten erschwert (Folkman, 1990). Um einer Mangelversorgung entgegenzuwirken sezernieren Tumorzellen angiogene Faktoren wie VEGF, FGF oder TGF α , was die Neubildung von Blutgefäßen bewirkt (Ferrara und Kerbel, 2005; Woodhouse et al., 1997). Dieser Prozess ist im Allgemeinen als Angiogenese bekannt. Neben der Versorgung mit Biomolekülen fördert die Neovaskularisierung jedoch auch die Metastasierung. Das bedeutet, dass Tumorzellen, die sich aus dem Zellverband lösen, über die Blut- bzw. Lymphwege in entfernte Gewebe und Organe transportiert werden und dort Metastasen ausbilden (Wyckoff et al., 2000). Einige Krebsarten bilden Metastasen in ganz bestimmten Organen aus, so sind Metastasen bei Brustkrebs häufig im Knochen, in der Leber, im Gehirn und in der Lunge zu finden. Prostatakarzinome hingegen metastasieren vorwiegend im Knochen (Chambers et al., 2002). Tumorzellen, die die Fähigkeit zur Metastasierung erlangt haben, besitzen charakteristische Eigenschaften: Sie müssen den hämodynamischen Scherkräften in den Blutgefäßen Stand halten, die Fähigkeit zur Extravasation aus den Blutgefäßen besitzen und die Eigenschaft aus vereinzelter Zellen durch Proliferation neue Mikrometastasen auszubilden (MacDonald et al., 2002).

Zusammengefasst besitzen Tumorzellen gegenüber normalen Zellen einen selektiven Überlebensvorteil, der sich in folgenden Faktoren widerspiegelt: Apoptoseresistenz, anhaltende Angiogenese, uneingeschränkte Proliferation, Invasion von Nachbargewebe und Metastasierung, herabgesetzte Sensibilität gegenüber wachstumshemmenden Faktoren sowie Unabhängigkeit bzw. Sensibilisierung gegenüber Wachstumsfaktoren (Hanahan und Weinberg, 2000).

2.2 *in vitro* Tumormodelle

Bei der Tumorprogression und Metastasierung spielt die unmittelbare Umgebung von malignen Zellen, neben der genetischen Instabilität, eine wichtige Rolle. Unter normalen physiologischen Bedingungen besitzen Organe und Gewebe eine dreidimensionale Struktur. Epitheliale Gewebe besitzen eine polarisierte Zellmorphologie (apikal, basal, basolateral), spezifizierte Zell-Zell-Kontakte (z.B. vermittelt durch Cadherine oder Selektine) und werden von der Basalmembran begrenzt (Johnson a RLWR, 2004). Das Verhalten bzw. das Schicksal von individuellen Zellen wird durch die Interaktion mit ihren direkten Nachbarzellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) bestimmt und kontrolliert (Barros et al., 1995; Ingber, 2006; Jacobson et al., 1997; Locascio und Nieto, 2001). In der Summe bestimmen diese Faktoren die Differenzierung, Apoptose, Proliferation oder Invasion von Zellen. Diese intakte und hochgradig organisierte Gewebearchitektur ist bei der Entstehung eines epithelialen Tumors – einem sogenannten Karzinom – zerstört (Abb. 2) (Debnath und Brugge, 2005). Studien haben gezeigt, dass die Karzinogenese ein Prozess ist, der in komplexen Zellverbänden und Geweben stattfindet und nicht in individuellen Zellen (Liotta und Kohn, 2001; Kunz-Schughart und Knuechel, 2002). Vor diesem Hintergrund ist es für Forscher auf Dauer unerlässlich geeignete Tumormodelle sowohl *-in vitro* als auch *in vivo*- zu etablieren, welche die unmittelbare Umgebung des Tumors miteinbeziehen.

Die meisten bisherigen Forschungsergebnisse im Bereich der Tumorbilogie stützen sich auf die Verwendung von Tumorzelllinien in der klassischen zweidimensionalen (2D) Zellkultur. In den vergangenen Jahren hat jedoch die Etablierung von Protokollen für die Generierung von dreidimensionalen (3D) Zellkulturmodellen stark zugenommen. Ein weiteres Hilfsmittel für das Studium der Tumorbilogie stellen Tiermodelle dar. Hier werden Mäusen oder Ratten humane Tumorzellen appliziert und so ein Tumorwachstum induziert (sogenannte Xenograft-Modelle).

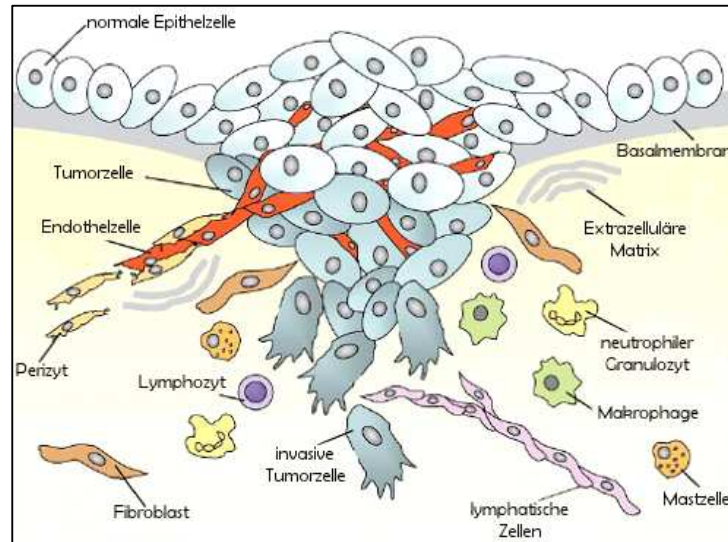


Abb. 2: Überblick über die Interaktion von Tumorzellen mit verschiedenen Zelltypen aus dem benachbarten Stroma (nach Joyce, 2005).

2.2.1 Dreidimensionale, multizelluläre Zellkulturmodelle

Dreidimensionale Zellkulturmodelle reflektieren die *in vivo* Situation eines soliden, avaskularen Tumors und die von Mikrometastasen viel realistischer als eine herkömmliche zweidimensionale Zellkultur. Im Vergleich zur 2D-Kultur ermöglicht die 3D-Kultur sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Kontakt und schafft so die Möglichkeit für einen komplexeren Signalaustausch zwischen den Zellen. Der Stand der Technik erlaubt eine reproduzierbare Generierung von Spheroïden mit definierter Geometrie (Ivascu und Kubbies, 2006; Kim, 2005). Multizelluläre Spheroïde spiegeln das Vorhandensein von heterogenen Zellpopulationen mit unterschiedlichem Phänotyp wider, was bedeutet, dass sich proliferierende Zellen nur in der Randzone des Spheroïds befinden, gefolgt von quieszenten Zellen im mittleren Teil und nekrotischen Zellen im Kern (Carlsson, 1977, Mueller-Klieser, 2000). Entsprechend ihrer Lage innerhalb des Spheroïds weisen die Zellen dann ein unterschiedliches Muster in der Stoffwechselaktivität und der Sauerstoffversorgung auf, vergleichbar mit der Konstellation im Tumor. Die Ausprägung der einzelnen Zellschichten hängt im Wesentlichen von der Größe und Morphologie bzw. der Kompaktheit der Zellaggregate ab. (Mueller-Klieser, 2000). Abhängig von der Art des Tumors, können nekrotische Zellen *in vivo* in einem Abstand von 50-250 μm zu benachbarten Blutgefäßen auftreten. In Spheroïden kann ein exponentielles Wachstum bei einem Durchmesser von 50-300 μm beobachtet werden. Wenn Spheroïde jedoch eine Größe von 1-4 mm im Durchmesser

erreichen, sinkt die Wachstumsrate, da hier nicht wie unter physiologischen Bedingungen eine Neovaskularisierung induziert werden kann (Gimbrone et al., 1972).

Eine desorganisierte Zellarchitektur ist ein klassisches Merkmal eines soliden Tumors *in vivo* (Debnath et al., 2002). Tumorzellen wachsen substratunabhängig, verlieren ihre Polarität, weisen unkoordinierte Zell-Zell-Verbindungen auf, enthalten oft deformierte Zellkerne und sind im Fall von humanen Brustkarzinomzellen unfähig Milchgänge auszubilden (Alford und Tylor-Papadimitrou, 1996). Bissell, Brugge und Kollegen revolutionierten anhand ihrer etablierten 3D-Modelle, basierend auf einer rekonstituierten Basallamina, das Verständnis für die Regulierung von normalen und tumorigenen Zellen (Muthuswamy et al., 2001; Nelson und Bissell, 2005; Weaver et al., 2002).

Ein anspruchsvolleres und authentischeres Modell stellt die Ko-Kultivierung von Tumorzellen mit Stromazellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen dar (O'Hare et al., 2001). Tumorzellen treten *in vivo* in direkten Kontakt mit Stromazellen und zusätzlich werden Tumore von Zellen des Immunsystems, beispielsweise Makrophagen, infiltriert (Kalluri und Zeisberg, 2006; Condeelis und Pollard, 2006). Die tumorassoziierten Fibroblasten (sogenannte TAFs) scheinen sich von denen aus normalen Geweben signifikant zu unterscheiden, da sie als hoch aktiviert gelten, vergleichsweise stark proliferieren und in ihrem Phänotyp mehr Myofibroblasten ähneln (Bhowmick et al., 2004; Elenbaas und Weinberg, 2001; Kalluri und Zeisberg, 2006). Mittels parakriner Rückkopplungswege scheinen diese tumorassoziierten Fibroblasten das Tumorwachstum und die Tumورprogression zu stimulieren und zu unterstützen. Es wird vielfach diskutiert, ob diese Art von Interaktion ein Schlüsselmechanismus bei der Progression von Tumoren sein könnte. Die Aufklärung dieser Interaktion liefert möglicherweise neue Therapieansätze für die Behandlung von Krebs (Joyce, 2005; Albini und Sporn, 2007).

2.2.2 Methoden zur Herstellung von 3D-Kulturen *in vitro*

Die Notwendigkeit für innovative und physiologischere Zellkulturmethoden, sowie die Suche nach Alternativen zu kostspieligen Tiermodellen und aufwendigen *in vivo* Studien haben dazu geführt, dass sich in den letzten 10 Jahren eine Vielzahl von Methoden und Techniken zur Generierung von 3D-Zellkulturmodellen entwickelt haben (Lee et al., 2008). Die am häufigsten verwendeten Techniken zur Induktion von dreidimensionalen Zellkulturen basieren auf der spontanen Aggregation von Zellen, sowie auf der Inkubation der Zellen in Rotationsschüttlern oder in „liquid overlay“-Kulturen.

Bei der spontanen Zellaggregation macht man sich zu Nutze, dass einige Tumorzellen dazu neigen sich in Zellclustern zu organisieren, sobald man verhindert, dass sie sich am Boden

von Zellkulturgefäßen anhaften können. Dies wird durch das Beschichten von Zellkulturplatten mit poly-Hydroxyethylmethacrylate (polyHEMA) erreicht, was zusätzlich ein freies Schwimmen der Aggregate im Medium bewirkt (Ghosh et al., 2005; Valentinis et al., 1998). Auch die Ausbildung von dreidimensionalen Ko-Kulturen aus Tumorzellen mit Fibroblasten ist auf polyHEMA beschichteten Zellkulturplatten möglich. Fibroblasten fördern sogar die Zellaggregation bei Tumorzellen, die nicht oder nur beschränkt zur homotypischen Aggregation fähig sind (eigene Beobachtungen). Bei den „liquid overlay“-Kulturen werden Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät, die zuvor mit Agarose oder mit Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen, Fibrin, Laminin) beschichtet wurden. Die von Bissell und Kollegen etablierten Protokolle basieren auf der Verwendung von Matrigel®, einem Extrakt aus Maustumorzellen, der besonders reich an ECM-Komponenten ist und mit dem sich eine Basallamina rekonstituieren lässt (Lee et al., 2007). Die induzierten Spheroide können auf den ECM-Komponenten wachsen oder in diese eingebettet werden. Bei der Kultivierung von Tumorzellen in Rotationsschüttlern vermeidet man ebenfalls den Zell-Substratkontakt, so dass die Zellen als Konsequenz aggregieren (entwickelt von Sutherland et al., 1970). Die Inkubation erfolgt so lange, bis sich Spheroide mit der gewünschten Größe formiert haben.

Weitere Hilfsmittel, für 3D-Kulturen, sind Mikropartikel mit einer Größe von 95-210 µm, die als Trägermatrix fungieren. Die Oberfläche dieser Partikel kann mit Dextran oder Kollagen beschichtet sein, was ein Anhaften der Zellen unterstützen soll. Dieses Surrogat ist vor allem bei Zellen hilfreich, bei denen mit den zuvor beschriebenen Technologien keine Aggregate induziert werden können (Tang et al., 1994). Vorgefertigte und biologisch abbaubare Kollagengerüste werden ebenfalls als physikalische Stützmatrix verwendet, in deren Hohlräumen sich Zellen anlagern und dreidimensionale Strukturen ausbilden können (Tan et al., 2001). Diese Art von Stützmatrix findet auch Anwendung bei der *in vivo* Geweberegeneration (Saito et al., 2001).

Die Verwendung der jeweiligen Technologie hängt stark von der Fragestellung ab, die es zu beantworten gilt. Nicht jede der zur Verfügung stehenden Methoden ist beispielsweise für Hochdurchsatzanalysen geeignet und meist bedarf die nachfolgende Analytik der Zellen einer aufwendigen Aufarbeitung der Spheroide, wie beispielsweise das Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Spheroide für die Analytik im Durchflusszytometer.

2.2.3 Die biologische Bedeutung der 3D-Zellmodelle

Dreidimensionale Zellkulturmodelle haben sich für die Aufklärung von onkogenen Signalwegen und der zellulären Aktivität von Onkogenen zu einer effektiven Methode entwickelt. Durch die Kultivierung von Zellen in einer gewebeähnlichen Umgebung können

Signalprozesse abgebildet werden, die eine *in vivo* Situation besser reflektieren, als eine 2D-Kultur.

Anhand einer *in vitro* 3D-Kultur kann zum Beispiel die Sensitivität von Tumorzellen auf zytotoxische Substanzen, ähnlich wie unter *in vivo* Bedingungen, abgebildet werden. Zellen der Brusttumormlinie MDA-MB-231 wiesen bei der Behandlung mit Cisplatin in 3D einen weitaus niedrigeren Wert für die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) auf als bei einer Behandlung einer klassischen 2D-Kultur (Ohmori et al., 1998). Ohmori und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass die Behandlung mit Cisplatin nur in der Spheroidkultur zur Hochregulierung von TGF- β 1 mRNA und dem Protein geführt hat, was in Zusammenhang mit Beobachtungen aus klinischen Daten steht, wo metastasierende Tumore nach Behandlung mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika eine erhöhte Expression und Sekretion von TGF- β aufwiesen. Eine Studie in Zusammenhang mit Apoptoseresistenz in 2D- versus 3D-Kulturen verdeutlichte, dass die Aktivierung von Integrin β 4 bei Brusttumorzellen, durch die exogene Gabe der ECM-Komponente Laminin, in 3D zur Resistenz gegen Apoptose-stimulierende Faktoren (Trail, TNF α) führte (Weaver et al., 2002).

Welches Potential unter anderem in den auf Matrigel basierten Experiment steckt konnten Muthuswamy und Kollegen eindrucksvoll beweisen, indem sie die transformierende Aktivität von HER2 in rekonstituierten, azinösen 3D-Strukturen von MCF-10A, einer nicht-tumorigenen Brustepithelzelllinie, belegten (Muthuswamy et al., 2001). Die Aktivierung von HER2 in etablierten, wachstumsarretierten und polarisierten dreidimensionalen Azini führte zur Reinitiierung der Zellproliferation und dem Verlust einer polarisierten Organisation der Zellen. Außerdem kam es zur Anreicherung von proliferierenden Zellen im Lumen der Azini, was deutlich einem tumorigenen Phänotyp entspricht. Dieses Modell ermöglicht Einblicke in die Mechanismen der frühen Tumorentstehung *in vitro*, wie sie mit einem herkömmlichen zweidimensionalen Zellmodell nicht nachvollziehbar sind.

2.3 Die Rezeptortyrosinkinase HER2 – ein Protoonkogen

HER2 (human epidermal growth factor receptor-2) gehört zur Familie der HER-Rezeptoren bzw. EGFR-Familie, zu denen unter anderem EGFR (HER1), HER3 und HER4 zählen. Die Mitglieder der HER-Familie sind strukturell eng verwandt und bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembranregion, einer kurzen Juxtamembrandomäne, gefolgt von der Kinasedomäne und dem C-Terminus, der nach Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste die Bindung von Adaptoren, Signalmolekülen und regulatorischen Proteinen favorisiert (Hynes und Lane, 2005). Die Bindung von Wachstumsfaktoren,

sogenannten Liganden, führt zur Homo- bzw. Heterodimerisierung der Rezeptoren und schließlich zu deren Aktivierung durch Transphosphorylierung (Heldin, 1995; Hubbard et al., 1998). Zu den Liganden der EGFR-Familie zählen EGF, TGF α , HB-EGF, Epi- und Amphiregulin, Betacellulin sowie verschiedene Isoformen der Heregulin/Neuregulin-Familie (Hynes und Lane, 2005). Eine besondere Ausnahme innerhalb der HER-Familie stellen die Rezeptoren HER2 und HER3 dar, da bisher noch kein Ligand für HER2 identifiziert werden konnte (Klapper et al., 1999) und HER3 keine intrinsische Kinaseaktivität besitzt (Carraway und Cantley, 1994). Als Konsequenz kann HER3 keine Homodimere bilden und benötigt demnach einen Ko-Rezeptor aus der HER-Familie zur Aktivierung. Im Vergleich dazu kann HER2 bei entsprechender Überexpression jedoch auch Homodimere ausbilden, die katalytisch aktiv sind (Worthylake et al., 1999; Yarden und Slwkowsky, 2001).

Das *ERBB2* Protoonkogen (auch bekannt als *neu* oder *c-ErbB-2*) ist auf dem Chromosom 17q12 lokalisiert und kodiert für ein Transmembranprotein mit einer Größe von 185 kDa. Unter Normalbedingungen spielt HER2 eine wichtige Rolle bei humanen Entwicklungsprozessen. HER2 wurde im Nervensystem, Knochen, Muskel, Haut, Lunge und im Darmepithel von humanen Embryonen nachgewiesen (Coussens et al., 1985; Quirke et al., 1989). Studien haben gezeigt, dass ein Nullallel für HER2 bei Mausembryonen bereits vor dem Entwicklungsstadium E11 letal ist (Lee et al., 1995).

Auch nach der Geburt ist HER2 an der Regulation der Brustentwicklung und des Brustwachstums beteiligt (Jones et al. 1996; Di Augustine and Richards, 1997).

Das kombinatorische Signalnetzwerk der HER-Moleküle untereinander, jedoch auch mit anderen RTK, ermöglicht eine spezifische Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen und steuert dadurch zelluläre Prozesse wie Proliferation, Überleben und Motilität der Zellen (Abb. 3) (Wieduwilt und Moasser, 2008).

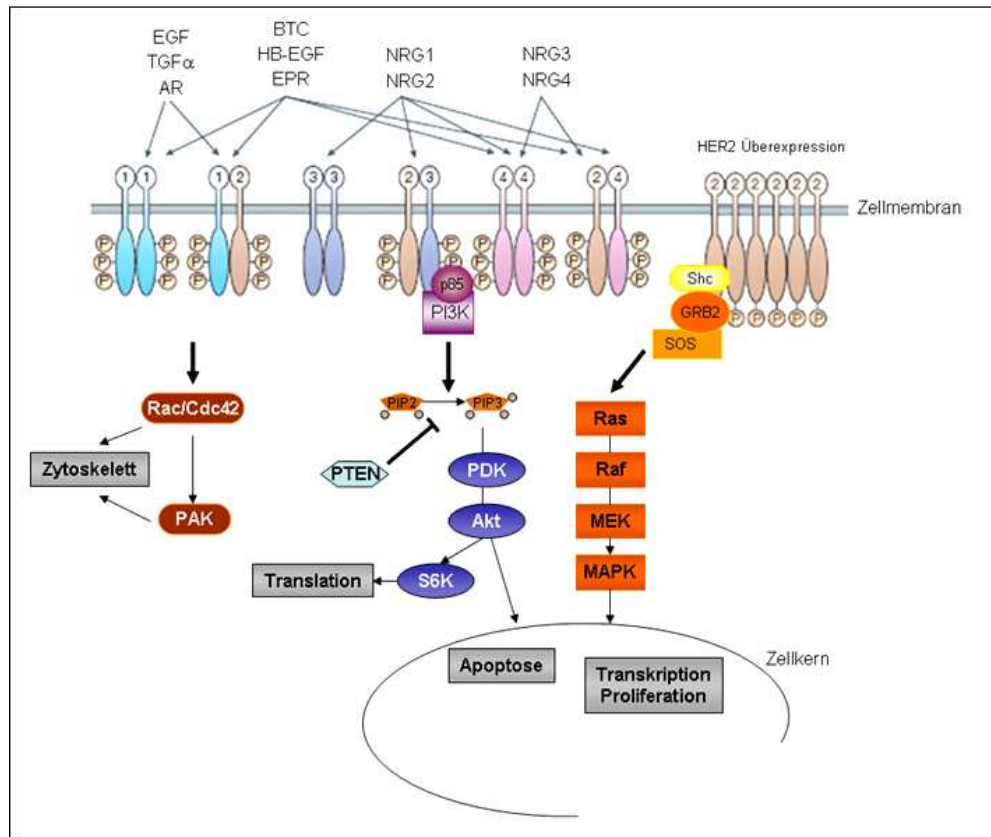


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der von HER2-aktivierten Signalkaskaden. HER2 bildet Homodimere oder Heterodimere mit anderen Mitgliedern der HER-Familie. Die Heterodimerisierung wird durch die Bindung von Liganden an HER1, HER3 oder HER4 induziert (EGF, epidermal growth factor; AR, amphiregulin; BTC, betacellulin; EPR, epiregulin; HB-EGF, heparinbinding EGF; NRGs, neuregulins; TGFα, transforming growth factor-α). HER3 besitzt sechs Bindungsmotive für die p85 Untereinheit von PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase). Die Rekrutierung von PI3K an HER3 führt zur Aktivierung PI3K und konvertiert den sekundären Botenstoff PIP2 (Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphat) in PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphat), woraus schließlich die Aktivierung von PDK (Phosphatidylinositol-dependent kinase) resultiert. PDK phosphoryliert Akt, was die Aktivierung von apoptotischen Signalwegen inhibiert und die Translation von überlebenswichtigen Proteinen reguliert. Der Tumorsuppressor PTEN (phosphatase tensin homologue) kann den PI3K-Akt-Weg inhibieren indem es PIP3 dephosphoryliert. An HER2 kann PI3K nur mittels der Adapterproteine Grb2 und GAB (Grb2-associated binding protein) binden. Die Homodimerisierung von HER2 führt zur Rekrutierung der Adapterproteine Shc und Grb2 und schließlich zur Aktivierung von MAPK (mitogen activated protein kinase). Dieser Signalweg steuert beispielsweise die Zellproliferation und -differentierung. (nach Hynes und Lane, 2005)

2.3.1 HER2-vermittelte Onkogenese und Signaltransduktion

Das transformierende Potential von HER2 wurde erstmals bei der systematischen Suche nach Onkogenen in Ratten postuliert (Shih et al., 1981; Schechter et al., 1984). Die retrovirale Transformation von humanen Brustepithelzellen mit HER2 führte zur Entstehung von Brusttumoren in orthotopen Xenograftmodellen (Brandt et al., 2001).

Die Relevanz von *ERBB2* als Protoonkogen wurde seitdem durch eine beachtliche Menge an klinischen Daten unterstützt. Die Überexpression des HER2-Proteins, basierend auf

Genamplifikation oder transkriptioneller Fehlregulation kann in 25-30% der Brust- und Ovarialkrebspatientinnen beobachtet werden und korreliert mit einer schlechten Prognose in Bezug auf Überleben und Tumorprogression (Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989). Durchschnittlich kann bei Brusttumoren eine *ERBB2*-Genamplifikation mit einer 25- bis 50-fachen Kopienzahl des *ERBB2*-Gens nachgewiesen werden und eine 40- bis 100-fache Zunahme der HER2-Proteinexpression, was zu einer Oberflächenexpression von bis zu zwei Millionen Rezeptoren führt (Venter et al., 1987; Kallioniemi et al., 1992). Kauraniemi und Kollegen konnten in einer Studie mit 330 primären Brusttumorproben zeigen, dass das HER2-Amplikon eine minimale Größe von 280 kb besitzt, so dass gleichzeitig weitere Gene koamplifiziert sind (Kauraniemi et al., 2003). Über die Bedeutung bzw. Konsequenz der koamplifizierten Gene (Abb. 4) ist noch verhältnismäßig wenig bekannt und bedarf daher weiterer Untersuchungen (Kauraniemi et al., 2003).

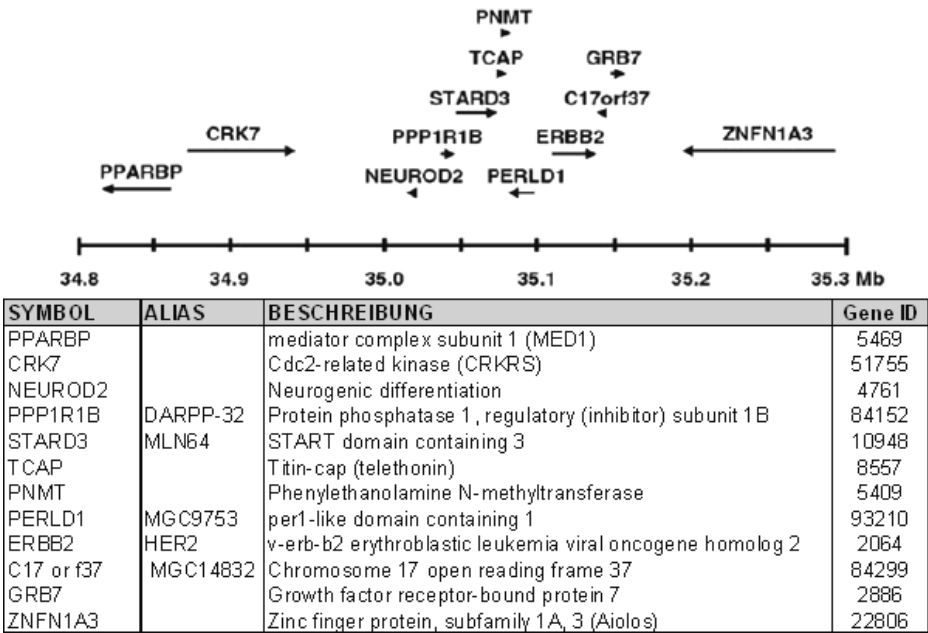


Abb. 4: Schematische Struktur des HER2-Amplikons bei humanem Brustkrebs. Zusammengefasst sind die Gene, die *ERBB2* am Locus 17q12-q21 umgeben und häufig koamplifiziert sind. Abhängig von der Krebsart variiert die Größe des Amplikons und kann zusätzliche benachbarte Gene enthalten. Die hier abgebildeten Gene repräsentieren die am häufigsten nachgewiesenen Gene des HER2-Amplikons. (nach Moasser, 2007).

Es wird vermutet, dass die *her2*-Genamplifikation ein sehr frühes Ereignis in der Brusttumorentstehung ist, da eine Amplifikation bereits in ca. 50% aller nicht-invasiven, duktaalen Karzinome *in situ* (ductales carcinoma in situ, DCIS), ein Subtyp, der ein Frühkarzinom beschreibt, beobachtet werden kann (Liu et al., 1992; Park et al., 2006). Eine HER2-Überexpression und -Amplifikation konnte auch in einer Subgruppe von Magen-, Ösophagus- und Endometriumkarzinomen, ebenfalls mit einem schlechten Krankheitsverlauf

assoziiert, nachgewiesen werden (Mimura et al., 2005; Morrison et al., 2006; Gravalos und Jimeno, 2008).

Die Dimerisierung der verschiedenen HER-Molekl e führt zur Aktivierung verschiedenster nachgeschalteter Signalwege. Die drei am besten charakterisierten Signalweiterleitungswege, die durch die HER-Mitglieder induziert werden, sind der Ras-MAPK-Weg (Ras-mitogen activated protein kinase-Weg), der PI3K-PKB/Akt-Weg (Phosphatidylinositol-3'-kinase/Proteinkinase B) und der PLC-PKC-Weg (Phospholipase C-Proteinkinase C-Weg) (Schlessinger, 2000; Blume-Jensen und Hunter, 2001; Prenzel et al., 2001). Welcher Signalweg favorisiert wird, hängt vornehmlich von der Zusammensetzung des HER2-Dimers ab. Die Heterodimerkomplexe aus HER2/HER3 sowie HER2/HER4 begünstigen als Folge der Bindung des Liganden Heregulin die Aktivierung des PI3K-PKB/Akt-Wegs. HER3 und HER4 enthalten im C-terminalen Bereich sechs Replikat e des Sequenzmotivs YXXM, was als Bindungsmotiv für die PI3K-SH2-Untereinheit dient (Carraway et al., 1995; Soltoff et al., 1996). Die Akt-Kinase, welche ein Schl sseleffektor von PI3K ist, wird an den aktivierten Rezeptor-PI3K-Komplex rekrutiert und reguliert dadurch die Zellproliferation und das  berleben der Tumorzellen (Marmor et al., 2004). HER2-Homodimere und EGFR/HER2 favorisieren die Signalweiterleitung über den Ras-MAPK- oder PLC-PKC-Weg. HER2 und EGFR besitzen im C-Terminus Sequenzmotive für die Bindung von Adaptorproteinen wie Grb-2 oder Shc, die eine Rekrutierung von Ras induzieren. Phospholipase C hingegen kann direkt über ein SH2-Bindemotiv an den aktivierten EGFR- bzw. HER2-Rezeptor binden (Marmor et al., 2004). Die Aktivierung dieser Signalkaskaden resultiert schließlich in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Fos, Jun, Myc oder Elk im Zellkern, welche die Gene für Zellproliferation, Zelladhäsion oder Zelldifferenzierung regulieren (Yarden und Sliwkowski, 2001).

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass HER2 mit anderen Oberflächenrezeptoren assoziiert sein kann, welche die nachgeschalteten Signalwege entsprechend modifizieren. Als Beispiel wäre hier die Assoziation von HER2 mit Integrinrezeptoren zu nennen. Falcioni und Kollegen konnten zeigen, dass in humanen Brustkarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien HER2 mit Integrin $\beta 4$ und $\beta 1$ präzipitiert werden kann (Falcioni et al., 1997). Ein weitere Indiz für eine Signalamplifikation von HER2 nach Komplexierung mit Integrin $\beta 4$ lieferten Guo und Kollegen (Guo et al., 2006).

2.3.2 Regulation der HER2-Aktivierung durch subzelluläre Lokalisation

Neben der ligandenvermittelten Aktivierung der HER-Mitglieder, bzw. der HER2-Aktivierung nach Homodimerisierung als Folge der Überexpression, gibt es noch weitere Mechanismen, die die Aktivität der HER-Moleküle beeinflussen können.

Die subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren in Caveolae auf der Zelloberfläche scheint einen Einfluss auf den Aktivierungsgrad von HER2 und EGFR zu haben (Couet et al., 1997; Engelman et al., 1998). Caveolae sind Invaginationen der Zellmembran, die durch die Strukturproteine Caveolin-1, -2 oder -3 stabilisiert werden. Caveolae zählen zu einer Subklasse der cholesterinreichen Mikrodomänen der Plasmamembran und unterscheiden sich von der Zusammensetzung der restlichen Zellmembran durch ihren Anteil an Cholesterin, Sphingomyelin und Glykosphingolipiden (Simons und Toomre, 2000). Ein interessanter Zusammenhang besteht zwischen der Expression von Caveolin-1 und der Regulation von HER2. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Expression von Caveolin-1 die Kinaseaktivität von HER2 reziprok reguliert (Sagara et al., 2004; Engelmann et al., 1998; Park et al., 2005). Betont wird dieser funktionelle Zusammenhang vor allem durch die Tatsache, dass Caveolin in verschiedenen Tumorzelllinien und humanen Tumoren herunterreguliert ist und es deshalb als Tumorsuppressor diskutiert wird (Razani et al., 2001). Mineo und Kollegen konnten zeigen, dass EGFR nach der Bindung seines Liganden EGF aus den Caveolae migriert (Mineo et al., 1999). Zusammengefasst kann man sagen, dass HER-Rezeptoren, die in Caveolae lokalisieren, einen niedrigeren Aktivierungszustand besitzen.

Eine weitere Möglichkeit Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu bündeln stellen planare lipidreiche Mikrodomänen dar, sogenannte „lipid rafts“. Auch sie enthalten Cholesterin, Sphingomyelin und Glykosphingolipide (Allen et al., 2007). Sowohl planare lipidreiche Mikrodomänen, als auch Caveolae zeichnen sich dadurch aus, dass sie schwer löslich in herkömmlichen Detergenzien wie Triton X-100 sind, was die Charakterisierung dieser Strukturen erschwert (Simons und Toomre, 2000).

Im Gegensatz zu den relativ statischen Caveolae besitzen planare glykosphingolipidreiche Mikrodomänen eine größere Dynamik und können sich zu größeren Verbänden zusammenschließen (Harder und Simons, 1997). Nagy und Kollegen konnten zeigen, dass nach der Stimulation von SKBR3-Zellen mit dem Wachstumsfaktor EGF in serumfreien Medium die Größe der HER2-Cluster auf der Zelloberfläche deutlich zugenommen hat, verbunden mit einer verstärkten Tyrosinkinaseaktivierung der Rezeptoren (Nagy et al., 1999). Es wird postuliert, dass die Organisation und Konzentration der HER2-Rezeptoren in den Lipidclustern stark mit der Rezeptoraktivierung korreliert. Die Abhängigkeit der HER2-

Aktivierung von der Lokalisation in Lipiddomänen kann durch die Behandlung von Zellen mit dem Gangliosidbiosyntheseinhibitor [D]-PDMP gezeigt werden. Nach Zugabe des Inhibitors kann eine Umverteilung von HER2 auf der Zelloberfläche beobachtet werden, gefolgt von einer Abnahme der HER2-Kinaseaktivität. Nach anschließender Inkubation mit exogenem Gangliosid GM3 konnte die Aktivierung von HER2 erneut induziert werden (Sottocornola et al., 2006).

Die Aktivierung der Rezeptoren innerhalb von planaren Lipidclustern hat meist eine Rekrutierung verschiedenster Signalmoleküle, wie Integrine oder zytoplasmatische Kinasen zur Folge, so dass diese subzellulären Mikrodomänen als richtungsgebende Signalplattformen betrachtet werden können (Simons und Toomre, 2000).

2.3.3 Die spezifische Inhibition von HER2 mittels Trastuzumab

Die Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen mit kleinen chemischen Molekülen ist weit verbreitet. In der Onkologie haben jedoch in den vergangenen zehn Jahren Inhibitoren auf der Basis von Biomolekülen, sogenannte therapeutische inhibitorische Antikörper, an Bedeutung gewonnen. Ein großer Vorteil solcher therapeutischer Antikörper in der Krebstherapie ist, dass sie entsprechende Antigene auf der Zelloberfläche von Tumorzellen mit hoher selektiver Spezifität binden können. Die Bindungsaffinität für ein bestimmtes Antigen kann dabei mit der biologischen Wirksamkeit korreliert werden (Carter, 2006).

2.3.3.1 Wirkmechanismen von Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin®) ist ein therapeutischer Antikörper, der spezifisch an HER2 bindet und die Proliferation von Tumorzellen, die HER2 überexprimieren, hemmt (Carter et al., 1992). Dieser Antikörper war der erste, der für die spezifische Therapie von HER2-überexprimierendem, metastasierendem Brustkrebs von der Arzneimittelbehörde FDA (food and drug administration) in den Vereinigten Staaten 1998 zugelassen wurde.

Trastuzumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper der an die Domäne IV der extrazellulären Domäne von HER2 bindet (Cho et al., 2003). Anhand zahlreicher *in vitro* und *in vivo* Studien im vergangenen Jahrzehnt wurden verschiedene Wirkmechanismen von Trastuzumab auf molekularer und zellulärer Ebene beschrieben. So verhindert die Bindung von Trastuzumab an HER2 die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege von Ras/MAPK und PI3K/Akt (Nahta und Esteva, 2007; Yakes et al., 2002). Ob dieser Effekt aus einer Trastuzumab-vermittelten Endozytose von HER2 resultiert wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Interessant ist, dass Trastuzumab nicht die Dimerisierung von HER2 mit anderen HER-Mitgliedern wie z.B. EGFR und HER3 blockieren kann. Das

bedeutet, dass die Signalweiterleitung der Heterodimere durch die Behandlung mit Trastuzumab nicht blockiert werden kann, was sich in einer geringeren Ansprechrate widerspiegelt (Nahta und Esteva, 2007). HER2-überexprimierende Zellen, die in Gegenwart von Trastuzumab inkubiert werden, weisen einen Zellzyklusarrest in G1 auf. Begleitet wird dieser Arrest von der Akkumulation von p27^{Kip1}, einem Inhibitor für Zyklin-abhängige Kinasen wie Cdk2 (cyclin dependent kinase2). p27^{Kip1} inhibiert den Zyklin E/Cdk2-Komplex, was einen Zellzyklusarrest in G1 bewirkt (Sliwkowski et al., 1999; Lane et al. 2000). Des Weiteren gibt es Anzeichen dafür, dass Trastuzumab auch Angiogenese inhibieren kann. Die Behandlung von murinen HER2-überexprimierenden Brusttumoren mit dem inhibitorischen Antikörper Trastuzumab hat eine verminderte Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF- α (transforming growth factor- α), Ang-1 (angiopoietin-1) und PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) zur Folge, die normalerweise an der Ausbildung von Blutgefäßen beteiligt sind und eine Vaskularisierung des Tumors fördern (Izumi et al., 2002; Wen et al., 2006).

Durch die Bindung von Trastuzumab an die extrazelluläre Domäne von HER2 wird die enzymatische Abspaltung des extrazellulären Teils von HER2 verhindert. Zusätzlich zum HER2-Protein der Größe 185 kDa kann in einigen Brusttumoren auch ein 95 kDa großes verkürztes zytoplasmatisches HER2-Fragment nachgewiesen werden, auch als p95HER2 bekannt (Christianson et al., 1998; Molina et al., 2001). Ergebnisse aus *in vitro* Studien mit HER2-überexprimierenden Zelllinien weisen darauf hin, dass die Metalloproteinase ADAM10 scheinbar eine wichtige Rolle bei der Abspaltung des extrazellulären Fragments spielt (Liu et al., 2006). In diesem Zusammenhang konnten Ali und Kollegen zeigen, dass bei 62% von 307 Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs die Menge an im Blut zirkulierendem extrazellulären HER2-Fragmenten nach Trastuzumabbehandlung signifikant abgenommen hat (Ali et al., 2008).

Eine hervorzuhebende Eigenschaft therapeutischer Antikörper ist die Fähigkeit, das Immunsystem mit Hilfe der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität, kurz ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity), zu aktivieren. Die zu den Lymphozyten zählenden NK-Zellen (natürliche Killerzellen) exprimieren den Fc-gamma-Rezeptor, der die Fc-Domäne des Trastuzumab IgG1 bindet und dadurch eine NK-Zellen vermittelte Lyse der Tumorzellen induziert (Clynes 2000; Arnould et al., 2006). Des Weiteren zeigen klinische Daten, dass bei Patienten mit erfolgreicher Trastuzumabtherapie eine höhere *in situ* Infiltration mit Leukozyten im Tumor nachgewiesen werden kann (Gennari et al., 2004). Vor kurzem konnten nun Musolino und Kollegen belegen, dass Patienten vom Genotyp Fc-gamma-RIIIa-

158 V/V eine viel bessere Ansprechrate auf die Behandlung mit Trastuzumab zeigten als Patienten ohne diesen Fc-gamma-Rezeptorvariante (Musolino et al., 2008).

2.3.3.2 Potentielle Resistenzmechanismen gegen Trastuzumab

Ein Großteil der Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs, die anfänglich auf die Behandlung mit Trastuzumab angesprochen haben, weisen innerhalb eines Jahres eine Progression des Tumors auf (Slamon et al., 2001; Esteva et al., 2002). Man spricht in diesem Fall von erworbener Trastuzumabresistenz. Dem gegenüber stehen Patientinnen, die eine *de novo* oder intrinsische Resistenz gegenüber einer Trastuzumab-Monotherapie aufweisen. Diese Gruppe umfasst einen Anteil von ca. 66-88% an Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs (Baselga et al., 1996; Vogel et al., 2002). Die Aufklärung dieser Resistenzmechanismen könnte helfen die Therapie von HER2-überexprimierenden Brustkrebspatientinnen zukünftig spezifisch auf die individuellen molekularen Marker abzustimmen um dadurch eine bessere Heilungschance zu ermöglichen.

In der Literatur sind einige Mechanismen, basierend auf *in vitro* Modellen, beschrieben, die für eine verminderte Ansprechrate von Trastuzumab verantwortlich sein könnten. Auch gibt es zu einigen Markern bereits Anhaltspunkte aus retrospektiven Analysen von humanen Tumorproben aus klinischen Studien mit Trastuzumab.

Ein Zellmodell ist die Trastuzumab-resistente Brustkrebszelllinie JIMT-1, die von Nagy und Kollegen beschrieben ist. Die Linie stammt von einer Patientin, deren Tumor eine *her2*-Genamplifikation aufwies und die nicht auf die Behandlung mit Trastuzumab angesprochen hat (Nagy et al., 2005). Die Autoren postulieren, dass die hohe Expression des membranassoziierten Glykoproteins MUC-4 (Mucin-4) das Epitop für die Bindung des Antikörpers an HER2 maskiert, so dass die Zellen resistent gegen die Behandlung mit Trastuzumab sind.

Unter Punkt 2.3.2.1 wurde beschrieben, dass Trastuzumab die Abspaltung der extrazellulären Domäne von HER2 verhindern kann. Neuere Studien zeigen jedoch, dass es im HER2-Transkript innerhalb der zytoplasmatischen Domäne drei alternative Möglichkeiten für eine Translationsinitiation gibt (Anido et al., 2006). Die stabile Transfektion der Brustkrebszelllinie T47D mit einem verkürzten HER2-Konstrukt führte in murinen Xenograftmodellen zu einem stärkeren Tumorwachstum im Vergleich zur parentalen Zelllinie. In diesem Fall hatte die Behandlung der Tiere mit Trastuzumab keinen Einfluss auf das Tumorwachstum, was das Potential dieser verkürzten HER2-Variante als Resistenzmechanismus gegen Trastuzumab unterstreicht.

Die Fähigkeit der HER-Mitglieder untereinander bestimmte Dimerkomplexe auszubilden spiegelt die hohe Dynamik und Flexibilität dieser Rezeptoren wider. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass die Dimerisierung mit anderen Rezeptortyrosinkinasen eine Möglichkeit darstellt den proliferationsinhibitorischen Effekt von Trastuzumab zu kompensieren. Die Charakterisierung von *in vitro* generierten Trastuzumab resistenten Zelllinien liefern Hinweise, dass Rezeptortyrosinkinasen wie IGF-1R oder c-MET eine wichtige Rolle als alternative Dimerisierungspartner spielen könnten (Nahta et al., 2005; Hsieh und Moasser, 2007). Ritter und Kollegen konnten eine erhöhte Expression und Phosphorylierung von EGFR im Vergleich zur parentalen Zelllinie nachweisen, sowie anteilig mehr HER2/EGFR-Komplexe. Parallel dazu war auf mRNA Ebene die Expression der Liganden EGF, TGF α , heparin-binding EGF, und Heregulin hochreguliert (Ritter et al., 2007).

Dass auch eine partielle Entkopplung der proliferationsgetriebenen Signalwege von den membranständigen HER-Komplexen die Ursache einer Trastuzumabresistenz sein kann verdeutlichen Publikationen, die eine Überaktivierung des PI3K-Signalwegs diskutieren (Nagata et al., 2004; Saal et al., 2005; Isakoff et al., 2005; Berns et al., 2007). Im Fokus stehen hierbei PTEN (phosphatase and tensin homolog) und die katalytische Untereinheit p110 α (PIK3CA) von PI3K. Der Tumorsuppressor PTEN dephosphoryliert PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) und reguliert dadurch die Signalweiterleitung über den Akt-Weg negativ. Die retrospektive Analyse von 54 Brusttumorproben ergab, dass Patientinnen mit einem „aktivierten“ PI3K-Signalweg (PTEN herunterreguliert oder PIK3CA-Mutant) nach Behandlung mit Trastuzumab signifikant schneller rezidiv wurden als Patientinnen mit „nicht-aktiviertem“ PI3K-Signalweg (PTEN hoch und PIK3CA wt) (Berns et al., 2007).

Die Induktion von aktivierenden Mutationen bei HER2 in Brusttumoren nach Trastuzumab-Behandlung ist bisher nicht bekannt.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Verwendung von zweidimensionalen Zellkultursystemen gilt in der Zellbiologie als Standardmethode für die Untersuchung von zellulären und molekularbiologischen Phänomenen auf Protein-, mRNA- und DNA-Ebene. Dieses Modellsystem weist jedoch Limitationen auf, wenn physiologisch relevante Fragestellungen wie Tumorentstehung, -progression und Metastasierung analysiert werden. Um zukünftig in der Onkologieforschung Fragestellungen möglichst gezielt bearbeiten zu können sind Zellmodelle, welche die physiologischen Eigenschaften eines Tumors widerspiegeln, unerlässlich.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, ein dreidimensionales Zellkultursystem zu etablieren, das die Ausbildung von avaskularen Sphroiden erlaubt. In den Sphroiden soll ein Zell-Zell-Kontakt zwischen den heterogenen Zellpopulationen einer Zelllinie möglich sein. Im Vergleich zu anderen 3D-Kulturexperimenten sollten keine klonalen Zellaggregate induziert werden, wie dies bei in Agarose eingebetteten Zellen der Fall ist. Das 3D-Zellkultursystem sollte unter anderem im Hochdurchsatzformat (96- und 384-Napf-Platten Format) anwendbar sein und eine einfache Analyse der Spheroide auf zellbiologischer und biochemischer Ebene gewährleisten.

Anhand von HER2-überexprimierenden Krebszelllinien sollte das herkömmliche 2D-Zellkultursystem mit dem etablierten 3D-System verglichen werden. Der Fokus lag hierbei auf der Charakterisierung von HER2, dessen Dimerisierungspartnern und den assoziierten Signalkaskaden. Mit Hilfe des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab, der spezifisch an HER2 bindet, sollte überprüft werden, ob sich Unterschiede in der Signalinhibition in den beiden Zellkultursystemen ergeben.

Um Einblicke in die Resistenzentwicklung gegen die Behandlung von Trastuzumab zu bekommen, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Trastuzumab resistente SKBR3-Zelllinie mit Hilfe des dreidimensionalen Zellkultursystems generiert werden. Anschließend sollte die Charakterisierung dieser resistenten Zelllinie auf zellulärer und molekularer Ebene erfolgen und entsprechende Marker bei humanen Tumorproben überprüft werden.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Tumorzellen in 2D- und 3D-Zellkultur

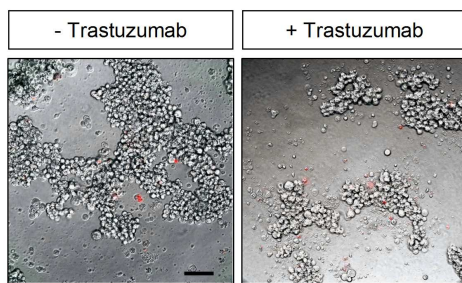
3.1.1 Etablieren des SKBR-3 Spheroidmodells

3.1.1.1 SKBR-3 Zellen proliferieren in 3D-Kultur

Bei der Zelllinie SKBR-3 handelt es sich um eine Brustkarzinomzelllinie, die HER2 aufgrund einer genetischen Amplifikation überexprimiert (10^6 Rezeptoren/Zelle), nicht aber EGFR und HER3 (Beerli et al., 1995). Die Inkubation von SKBR-3 auf poly-HEMA beschichteten Zellkulturplatten führt zur spontanen Aggregation der Zellen und zur Ausbildung von dreidimensionalen Zellverbänden. Diese Spheroide spiegeln die physiologische Struktur eines avaskularen Tumors bzw. von Metastasen wider, wie sie möglicherweise zu Beginn der Tumorentstehung bzw. -ausbildung vorliegen.

SKBR-3-Zellen bilden auf poly-HEMA beschichteten Platten Spheroide mit einem Durchmesser von 100-400 μm aus, die frei im Zellkulturmedium schwimmen (Abb. 5A, ohne Trastuzumab). Die Morphologie der SKBR-3-Aggregate lässt eine Einzelzellstruktur erkennen und weist im Vergleich zu anderen Spheroidmodellen eine geringe Kompaktheit auf (Abb. 5A) (Ivascu and Kubbies, 2006).

A



B

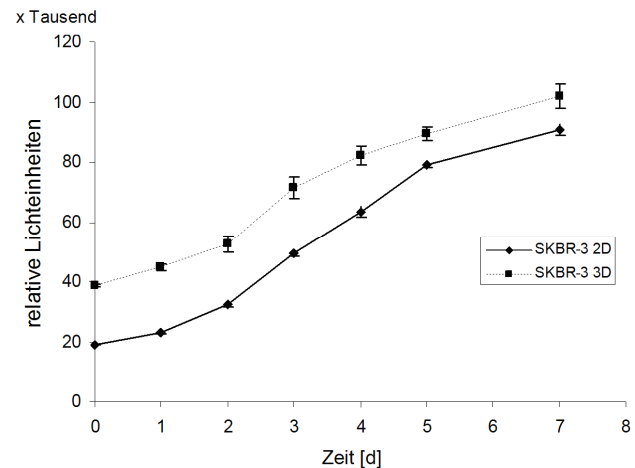


Abb. 5: Überprüfen der Zellviabilität und Proliferation von SKBR-3 in 3D-Kultur. **A** Phasenkontrastaufnahme von SKBR-3 in 3D-Kultur. SKBR-3 wurden in einer poly-HEMA beschichtete 96-Napfplatte für 7 Tage jeweils ohne oder in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ Trastuzumab inkubiert. Für den Nachweis von nekrotischen Zellen wurden die Zellaggregate anschließend mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid gefärbt und im Mikroskop beurteilt. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 μm . **B** Wachstumskurve einer SKBR-3 2D- und 3D-Zellkultur. Mittels CellTiter Glo® Reagenz wurde die Anzahl lebender Zellen, angegeben in relativen Lichteinheiten, gemessen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus fünf Replikaten und die Standardabweichung.

Zuerst wurde die Proliferation der SKBR-3 Zellen auf poly-HEMA beschichteten Platten untersucht. Aus einer exponentiell wachsenden Zellkultur wurden für das 3D-Experiment $1,2 \times 10^4$ Zellen pro Napf auf einer poly-HEMA beschichteten 96-Napfplatte ausgesät und für den 2D-Ansatz 6×10^3 Zellen pro Napf. Die Zahl der lebenden Zellen wurde mittels CellTiter Glo® zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und eine Wachstumskurve erstellt. Mit Hilfe des CellTiter Glo® Reagenz wird der ATP-Gehalt der Zellen bestimmt, der direkt mit der Anzahl lebender Zellen korreliert. Wie in Abbildung 5B gezeigt wird, proliferieren die Zellen in 3D-Kultur. Die Proliferationsrate ergab eine Verdopplung der Zellzahl in 3D nach 3,7 Tagen und in 2D nach 2,4 Tagen. Die Verlangsamung der Zellproliferation ist ein charakteristisches Merkmal von Spheroïden (Sutherland, 1988; Ivascu und Kubbies, 2006). Sie ist darauf zurückzuführen, dass in Spheroïden ($>200-300 \mu\text{m}$ im Durchmesser) aufgrund ihrer Kompaktheit und Geometrie nur noch die peripheren Zellen proliferieren (Hamilton, 1998).

3.1.1.2 Keine Induktion von Nekrose im Inneren der Zellaggregate

Spheroïde und sehr kompakte Zellaggregate zeigen eine charakteristische, konzentrische Anordnung von heterogenen Zellpopulationen. Zur Spheroïdmitte hin nimmt die Anzahl der proliferierenden Zellen stark ab, so dass im Kern meist nekrotische Zellen akkumulieren (Hamilton, 1998; Sutherland, 1988). Wie in Abbildung 5A zu erkennen ist, entstehen nach Inkubation von SKBR-3 Zellen auf poly-HEMA beschichteten Platten Zellaggregate mit einem Durchmesser von $100-400 \mu\text{m}$. Um zu überprüfen, ob sich innerhalb von 7 Tagen nekrotische Bereiche im Kern der Zellaggregate bilden, wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Innerhalb der Inkubationsdauer von 7 Tagen konnten keine eindeutig PI-positiven Zellen im Inneren der Spheroïde nachgewiesen werden, so dass die Anwesenheit von nekrotischen Zellen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 6A).

Da die Entstehung einer Nekrose auch auf eine mangelnde Sauerstoffversorgung im Kern von Spheroïdmodellen und Tumoren zurückzuführen ist, sollte zunächst die Sauerstoffversorgung in den Spheroïden untersucht werden (Shweiki et al., 1995).

Ein bekannter Hypoxiemarker zum Nachweis einer mangelnden Sauerstoffversorgung ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1). HIF-1 ist im aktiven Zustand ein Heterodimer, das sich aus einer HIF-1 α - und der HIF-1 β -Untereinheit zusammensetzt (Semenza, 2003). Um die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff bei dem in dieser Arbeit verwendeten 3D-Modell zu überprüfen, wurde HIF-1 α herangezogen, da diese Untereinheit

bei Hypoxie induziert wird (Rankin und Giaccia, 2008). SKBR-3 Zellen wurden für 3 und 7 Tage in 3D inkubiert, um anschließend die HIF-1 α Expression im Western-Blot zu überprüfen. Zum Vergleich wurde das Zelllysat einer subkonfluenten 2D-Kultur analysiert. Als Kontrolle für die HIF-1 α Induktion unter hypoxischen Bedingungen wurde der Eisenchelator 2'2'-Dipyridyl benutzt, der Sauerstoffmangel vortäuscht. Unter 2'2'-Dipyridyl nimmt die HIF-1 α Expression stark zu (Abb. 6, Spur1). Dagegen kam es während einer Inkubationsdauer von 7 Tagen zu keiner signifikanten Induktion von HIF-1 α in den Sphroiden (Abb 6, Spur 7).

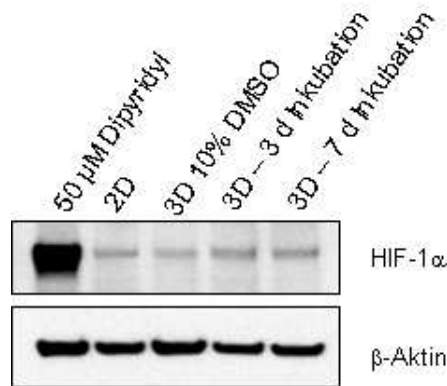


Abb. 6: Western-Blot Analyse der HIF-1 α Expression in 2D- und 3D-Kultur bei SKBR-3. SKBR-3 wurden in 96-Napfplatten in 2D und 3D inkubiert. Um Sauerstoffmangel vorzutäuschen wurden SKBR-3 in 3D für 4 h mit 50 μ M 2'2'-Dipyridyl (Spur 1) inkubiert. Als weitere Kontrolle wurden die Zellen in 3D für 7 d mit 10% DMSO (Spur 3) inkubiert. Mittels Nuclear Extract Kit von Active Motif wurden die Kernproteine angereichert. Die Kernfraktion und die zytoplasmatische Fraktion wurden jeweils mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die HIF-1 α -Expression wurde in der Kernfraktion im Western-Blot überprüft. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, das in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen wurde. Pro Spur wurden jeweils 30 μ g Protein aufgetragen.

Eine ausreichende Sauerstoffversorgung in den Sphroiden ist während des gesamten Inkubationszeitraums von 7 Tagen gewährleistet.

3.1.2 Trastuzumab inhibiert die Zellproliferation bei SKBR-3 und SKOV-3 in 3D-Kultur

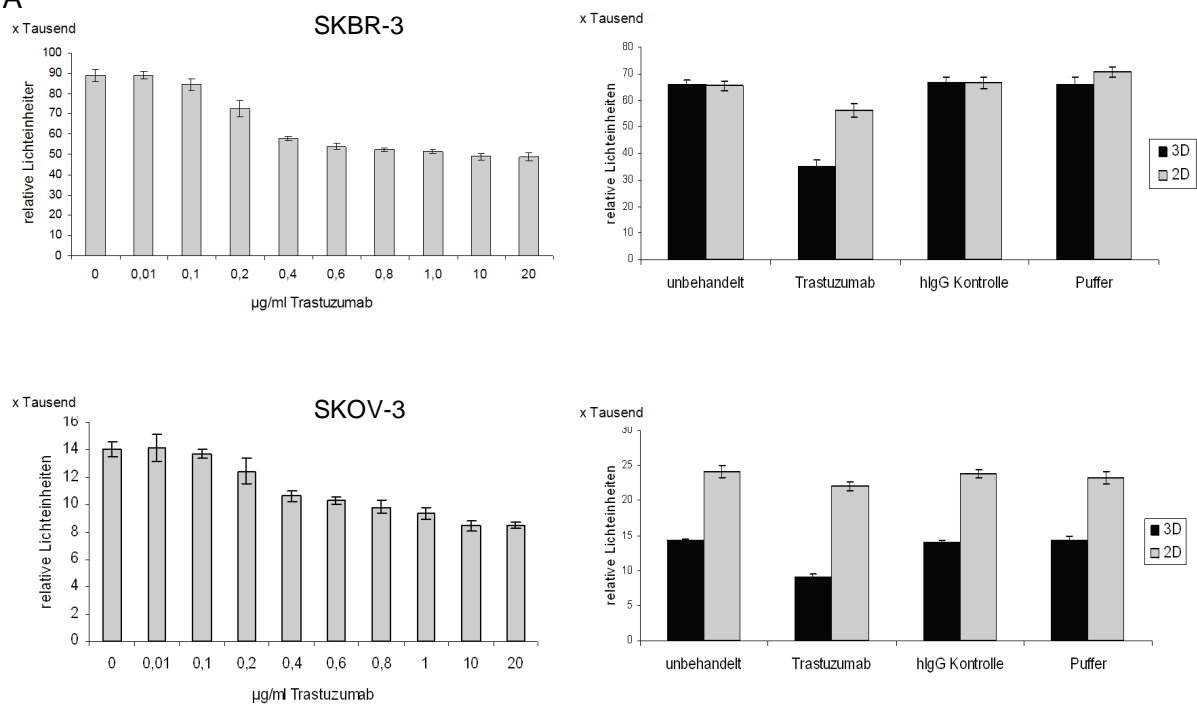
Bei Trastuzumab handelt es sich um einen rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörper, der an die extrazelluläre Domäne der Rezeptortyrosinkinase HER2 bindet und dadurch die Aktivierung des Rezeptors inhibiert. Der Großteil der Experimente zur Charakterisierung des inhibitorischen Effekts von Trastuzumab auf die Zellproliferation wurde in der klassischen 2D-Zellkultur durchgeführt (Hudziak et al., 1989; Cuello et al., 2001; Longva et al., 2005; Ginestier et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde der proliferationsinhibitorische Effekt von Trastuzumab auf die Krebszelllinien SKBR-3 (Brustkarzinomzelllinie) und SKOV-3 (Ovarialkarzinomzelllinie) in 2D- und 3D-Zellkultur in Gegenwart von 10% Serum und ohne zusätzliche Stimulation mit Wachstumsfaktoren untersucht. Beide Zelllinien zeigen eine genomische *ERBB2*-Amplifikation, die zur Überexpression von HER2 führt. Die Proliferation von SKBR-3 und SKOV-3 in 3D-Kultur wurde durch Trastuzumab, in Abhängigkeit von der Konzentration, inhibiert (Abb. 7A). Nach Behandlung von SKBR-3 mit 10 µg/ml Trastuzumab für 7 Tage in 3D wurde die Zellviabilität zu 48 % inhibiert, wohingegen in 2D nur eine Inhibition von 16% erreicht wurde (Abb. 7A). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Linie SKOV-3 beobachtet, was zeigt, dass die Reduktion der Zellzahl in 3D-Kultur nicht spezifisch für SKBR-3 ist. Bei SKOV-3 wurde in 3D eine Inhibition von 35 % und eine signifikant schwächere Inhibition von 8% in der klassischen 2D-Kultur gezeigt (Abb. 7A). Der proliferationsinhibitorische Effekt von Trastuzumab wird auch durch die Größe der Zellaggregate verdeutlicht, die nach Behandlung viel kleiner sind (Abb. 7B). Die Spheroide von SKOV-3 sind kompakter als die von SKBR-3 Zellen und lassen keine definitive Einzelzellstruktur auf der Spheroideoberfläche erkennen (Abb. 7B).

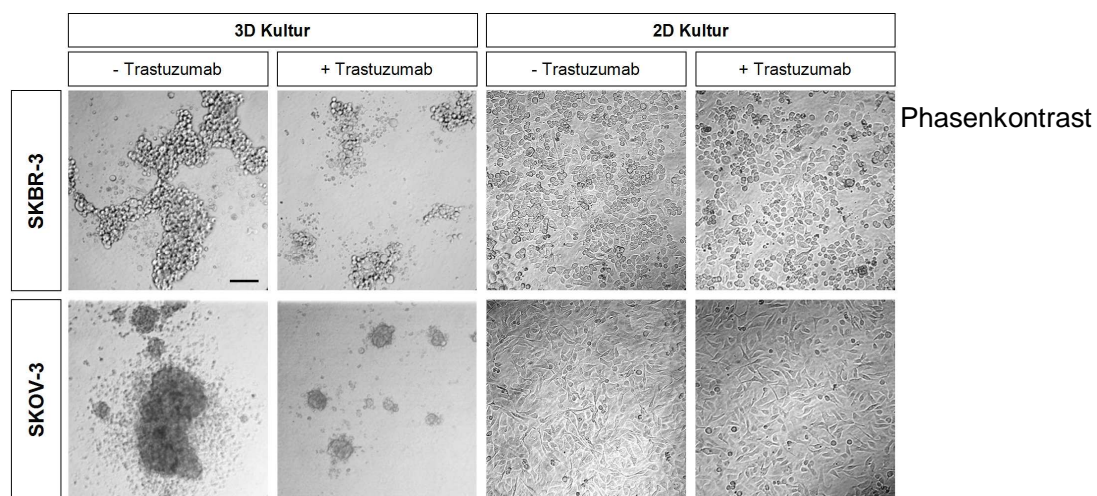
Die Färbung der SKBR-3 Zellen mit Hoechst 33342, einem Vitalfarbstoff, nach 24 h, 3, 5 und 7 Tagen spiegelt wider, dass die Inhibition der Proliferation nicht auf eine Subpopulation beschränkt ist und Trastuzumab die Ausbildung von Zellaggregaten nicht beeinträchtigt (Abb. 7C).

Eine Induktion von Apoptose als Konsequenz der Trastuzumab Behandlung bei SKBR-3 kann ausgeschlossen werden, da die Färbung der Zellaggregate mit PI nach 7 Tagen keine Hinweis auf tote Zellen lieferte (Abb. 5A). Ebenso kann eine stressinduzierte und somit erhöhte Sensitivität für Trastuzumab im 3D-Modell ausgeschlossen werden, da zuvor gezeigt wurde, dass SKBR-3 Zellen in 3D-Kultur proliferieren (siehe 3.1.1.1).

A



B



C

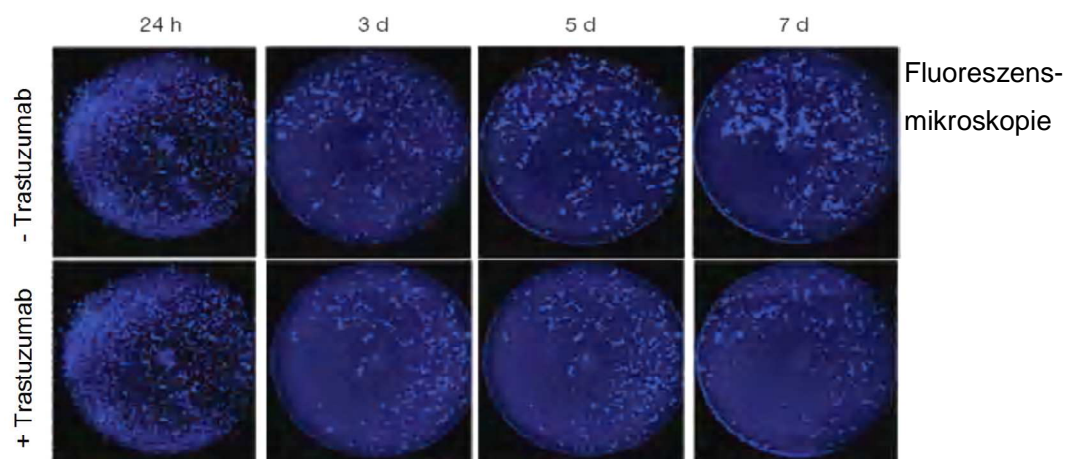


Abb. 7: Trastuzumab inhibiert die Zellproliferation in 3D-Kultur und beeinflusst die Zellaggregation nicht. SKBR-3 und SKOV-3 wurden als 2D- und 3D-Kultur inkubiert. Für die 2D-Kultur wurden die Zellen, 24 h vor Behandlung mit Trastuzumab, in unbeschichtete 96-Napfplatten ausgesät. **A** Dargestellt ist das Zellwachstum in Abhängigkeit von der Trastuzumab Konzentration. Die Zellen wurden jeweils ohne und mit Trastuzumab, sowie mit einer entsprechenden Isotypkontrollen (hIgG) und Pufferlösung, für 6 (SKOV-3) und 7 (SKBR-3) Tage inkubiert. Die Messung der Zellproliferation erfolgte mittels CellTiter Glo®. Das linke Diagramm zeigt die konzentrationsabhängige Inhibition der Zellen und das rechte Diagramm die Inkubation der Zellen in Gegenwart von 10 µg/ml Trastuzumab, 10 µg/ml humanem IgG und Puffer. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der relativen Lichteinheiten aus fünf Replikaten und die Standardabweichung. **B** Phasenkontrastaufnahme von 2D- und 3D-Zellkulturen nach jeweils 6 (SKOV-3) und 7 (SKBR-3) Tagen Inkubation. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 µm. **C** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellaggregation von SKBR-3 in 3D-Kultur ohne und mit 10 µg/ml Trastuzumab. Die Färbung der DNA erfolgte mit 10 µg/ml Hoechst 33342.

3.1.3 Unterschiedliche Signalwegaktivierung in 3D-Kultur

3.1.3.1 Induktion der HER2-Phosphorylierung und Änderung der assoziierten Signalwege in 3D-Kultur

Um den Effekt der erhöhten Responsivität auf Trastuzumab in 3D-Kultur zu verstehen, wurden verschiedene Signalproteine im Umfeld des HER2-Netzwerkes untersucht und verglichen, ob sich deren Aktivierung in 3D anders gestaltet als in 2D. Hierfür wurden SKBR-3 für 48 h in 2D- und 3D-Kultur inkubiert und die Zelllysate im Western-Blot analysiert.

Besonders auffällig war die induzierte Phosphorylierung des Tyrosinrests 1248 von HER2 in 3D-Kultur (Abb. 8A). Allein die Kultivierung der Zellen auf poly-HEMA beschichteten Platten und die in Folge eintretende Aggregation führt zu einer stärkeren Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase HER2. Die Mitglieder der HER-Familie EGFR und HER3 zeigten ebenfalls eine stärkere Phosphorylierung unter 3D-Bedingungen, wobei EGFR eine Induktion der Phosphorylierung von Y1173 und HER3 von Y1298 aufwies. Alle beschriebenen Tyrosinreste befinden sich in der Autophosphorylierungsdomäne der Rezeptoren (Downward et al., 1984; Kim et al., 1994; Dankort et al., 2001). Tyrosin 1248 ist die wichtigste HER2-Autophosphorylierungsstelle und aktiviert durch Rekrutierung des Adapterproteins Shc den Ras/Raf/MAPK Signalweg, der die Zellproliferation reguliert (Kwon et al., 1997; Dankort et al., 2001). Die Menge an exprimiertem HER2-Protein ist in beiden Zellkultursystemen unverändert, so dass die erhöhte Aktivierung des Rezeptors nicht auf eine Erhöhung der Rezeptorexpression zurückzuführen ist. HER3 zeigt ein vergleichbares Expressionsniveau in beiden Systemen, im Gegensatz dazu ist die Expression von EGFR in 3D deutlich herunterreguliert. Die Inkubation der Zellen in Gegenwart von 10 µg/ml Trastuzumab führte

A

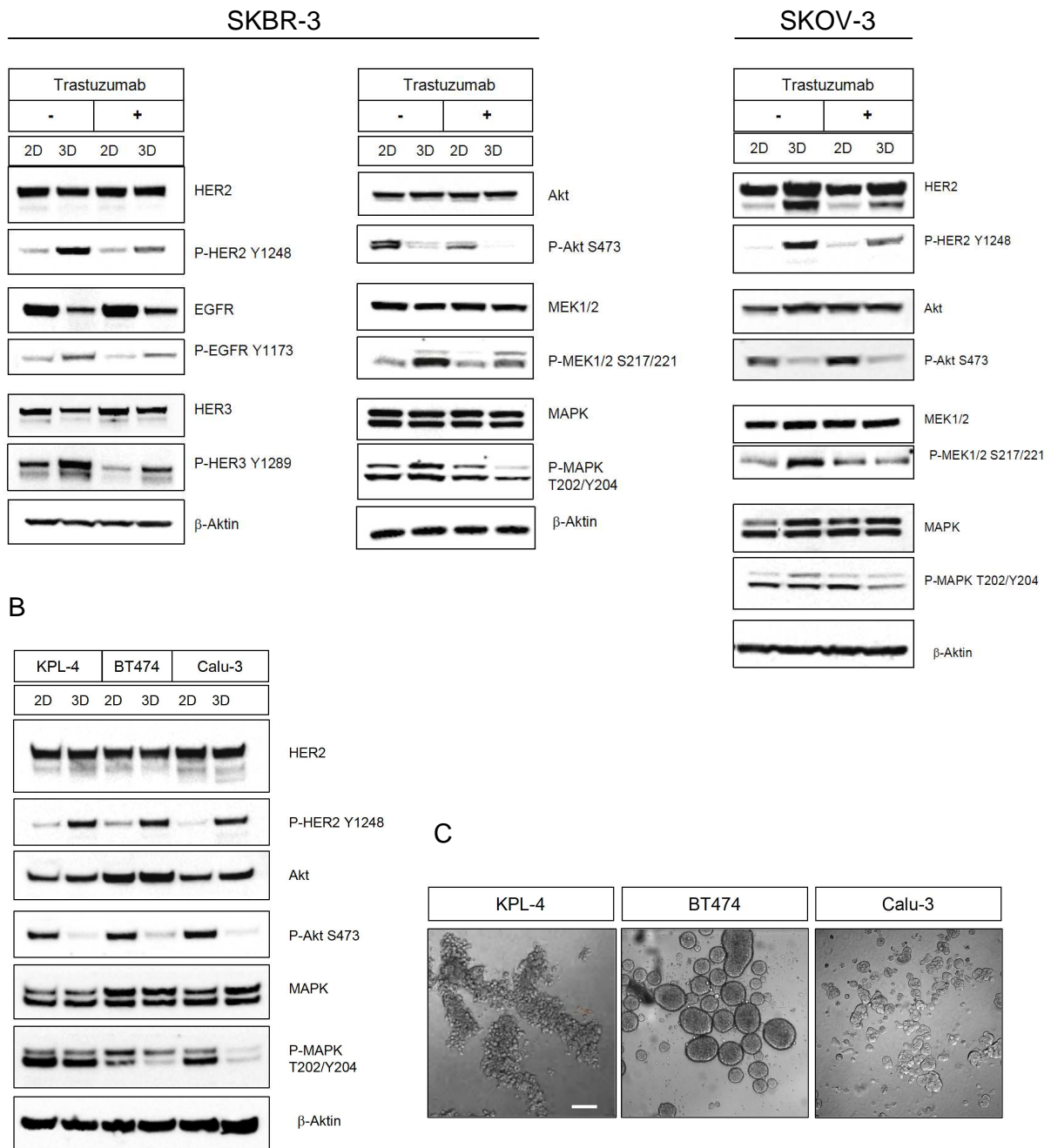


Abb. 8: HER2 und MEK1/2-MAPK sind in 3D-Kultur verstärkt aktiviert und Akt ist herunterreguliert. **A** Western-Blot Analyse von SKBR-3 und SKOV-3 in 2D- und 3D-Zellkulturen. Die Zellen wurden jeweils ohne und in Gegenwart von 10 µg/ml Trastuzumab für 48 h inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Pro Spur wurden jeweils 25 µg Gesamtprotein aufgetragen. **B** Western-Blot-Analyse von KPL-4, BT474 und Calu-3 in 2D- und 3D-Kultur. Die Zellen wurden für 48 h inkubiert und dann wie unter 4A beschrieben analysiert. **C** Phasenkontrastaufnahme von KPL-4, BT474 und Calu-3 in 3D-Kutlur. Die Morphologie der Spheroide wurde nach 7 Tagen beurteilt. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 µm.

zu einer signifikanten Abnahme des Phosphosignals bei HER2 (Y1248) in 3D-Kultur und bei HER3 (Y1298) in 3D- und 2D-Kultur (Abb. 8A).

Die Homodimerisierung des HER2-Rezeptors bzw. die Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der HER-Familie führt zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege. Die wichtigsten Signalwege, die von den HER-Rezeptoren aktiviert werden, sind der MAPK-Weg und der PI3K/Akt-Weg, wobei die jeweiligen Signalwege charakteristisch für die jeweiligen HER-Dimere sind (Yarden und Sliwkowski, 2001). Um nun die Unterschiede in der Signalweiterleitung in 2D- und 3D-Kulturen zu untersuchen, wurde der Aktivierungsgrad der Signalproteine Akt, MEK1/2 (MAPK Kinase) und MAPK (p44/42 MAPK, im weiteren Text fortan als MAPK bezeichnet) im Western-Blot in Zellextrakten analysiert.

Die SKBR-3 Zellen aus der 2D-Kultur zeigten eine stärkere Phosphorylierung und somit Aktivierung von Akt am Serinrest 473 als die aus der 3D-Kultur, bei gleicher Akt Expressionsstärke (Abb. 8A). Im Gegensatz dazu sind MEK1/2 und MAPK, gemessen an der Phosphorylierung von S217/221 bei MEK1/2 und T202/Y204 bei MAPK, in der 3D-Kultur stärker aktiviert (Abb. 8A).

Bei der Ovarialkarzinomlinie SKOV-3 wurde ein ähnliches Aktivierungsmuster beobachtet. Auch hier ist HER2 sowie MEK1/2 und MAPK in 3D stärker phosphoryliert (Abb. 8A). Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung von Akt in der 3D-Kultur auch herunterreguliert (Abb. 8A).

Die Untersuchung drei weiterer HER2-überexprimierender Zelllinien (Brustkarzinomzelllinien: KPL-4 und BT474; Lungenkarzinomzelllinie: Calu-3) ergab ebenfalls eine erhöhte HER2 Phosphorylierung in 3D, verglichen mit 2D (Abb. 8B). Auch die Phosphorylierung von Akt war in 3D-Kultur herunterreguliert (Abb. 8B). Eine stärkere Aktivierung von MAPK in 3D-Kultur konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 8B). KPL-4, BT474 und Calu-3 bilden auf poly-HEMA beschichteten Zellkulturplatten Spheroide aus, die sich in ihrer Morphologie unterscheiden (Abb. 8C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation von HER2-überexprimierenden Zellen in 3D eine Aktivierung von HER2 induziert und zur Herunterregulierung der Akt-Phosphorylierung führt. Der Effekt war unabhängig vom Tumorzelltyp. Im Fall von SKBR-3 und SKOV-3 wird in 3D außerdem eine verstärkte Aktivierung des MEK1/2-MAPK-Signalwegs beobachtet, welche durch Trastuzumab inhibiert wird.

3.1.3.2 Aktivierung von Integrin β 4 und Rac1/PAK2 in 3D-Kultur

Integrine sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt, wie an der Vermittlung des Zell-Zell-Kontakts, der Organisation des Zytoskeletts und der Aktivierung intrazellulärer Signalwege (Guo und Giancotti, 2004). Eine besondere Rolle bei der

Tumorentstehung und Metastasierung scheint Integrin $\beta 4$ zu spielen, da es in verschiedenen Tumoren oft verstärkt aktiviert ist (Mercurio and Rabinovitz, 2001) und die Signalaktivierung der Rezeptortyrosinkinasen HER2, EGFR und Met fördert (Mariotti et al., 2001; Trusolino et al., 2001; Guo et al., 2006). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Integrine den Rac/PAK-Signalweg regulieren können, als Folge einer Integrin vermittelten Rekrutierung des Rac Proteins an die Zellmembran (Symons, 2000; delPozo et al., 2000). Rac ist dadurch in der Lage, PAK, einen der am besten charakterisierten Rac Effektoren, zu aktivieren, was Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts und die Zellproliferation hat (Symons, 2000).

Um die Auswirkung der 3D-Kultur auf die Integrinaktivierung zu untersuchen, wurden SKBR-3 Zellen in 2D und 3D kultiviert und die Phosphorylierung von Integrin $\beta 4$, sowie die der assoziierten Proteine Rac1 und PAK, untersucht.

Aus Abbildung 9 ist ersichtlich, dass die Inkubation der SKBR-3 Zellen für 48 h in 3D-Kultur eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes 1526 bei Integrin $\beta 4$ induziert. Dies wurde durch Trastuzumab nicht verhindert. Im Vergleich dazu konnte in der 2D-Kultur kaum phosphoryliertes Integrin $\beta 4$ nachgewiesen werden (Abb. 9). Bei anschließender Analyse des assoziierten Rac1/PAK-Signalwegs wurde gezeigt, dass Rac1 nur in 2D-Kultur eine starke Phosphorylierung an Serin 71 aufweist (Abb. 9).

Dieser Serinrest kann von Akt phosphoryliert werden und inaktiviert dadurch Rac1 (Kwon et al., 2000). In 3D-Kultur war kaum eine inhibitorische Phosphorylierung von Rac1 nachweisbar, jedoch eine signifikante Phosphorylierung von PAK2 an Serin 141, die ebenfalls in Gegenwart von Trastuzumab stabil blieb (Abb. 9). Serin 141 ist wichtig für eine vollständige PAK2 Aktivierung und geht einher mit der zuvor beschriebenen Rac1 Aktivität (Jung und Traugh, 2005).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Änderungen der Signalaktivierung nicht allein auf HER2 und dessen assoziierte Signalkaskaden beschränken.

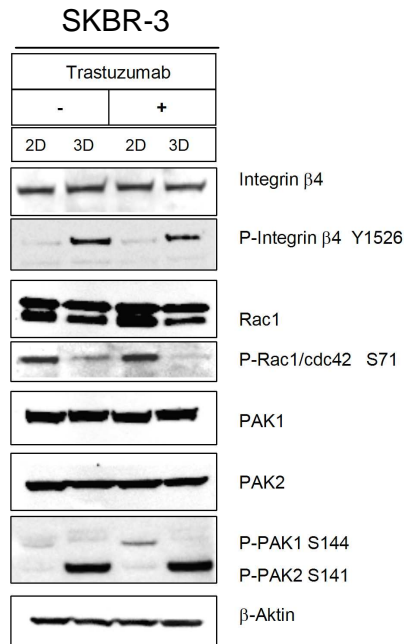


Abb. 9: Integrin β 4 und PAK2 sind nur in 3D-Kultur aktiviert. Western-Blot Analyse von SKBR-3 in 2D- und 3D-Kultur. Die Zellen wurden jeweils ohne und in Gegenwart von 10 μ g/ml Trastuzumab für 48 h inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Pro Spur wurden jeweils 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

3.1.3.3 Verringerte Assoziation von HER2/HER3-Heterodimeren und unterschiedliche Rekrutierung von Adapterproteinen in 3D

Um die Ursache für die verstärkte Aktivierung des HER2-Rezeptors in 3D-Kultur und die damit verbundenen Signalwege aufzuklären, wurde die Konstitution des HER2-Signalkomplexes mittels Kopräzipitation von HER2 und den assoziierten Proteinen untersucht. Gleichzeitig sollten die kopräzipitierten Proteine Auskunft über die in 2D und 3D aktivierten Signalwege geben. Hierfür wurde HER2 mittels anti-ErbB2 Affibody Molecule[®] jeweils aus normierten Zelllysaten einer 2D- und einer 3D-Kultur präzipitiert und im Western-Blot analysiert. Bei anti-ErbB2 Affibody Molecule[®] handelt es sich um hoch affines und für HER2 spezifisches Protein. An Agarose konjugiert stellt es aufgrund seiner geringen Größe und hohen Stabilität eine nützliche Alternative zur klassischen Immunopräzipitation dar. SKBR-3 Zellen wurden dazu unter den jeweiligen Kulturbedingungen für 4, 8 und 24 h ohne und in Gegenwart von Trastuzumab inkubiert.

In 3D-Kultur konnte während der gesamten Inkubationsreihe eine verringerte Assoziation von HER2 mit dem Rezeptor HER3 im Vergleich zur herkömmlichen 2D-Zellkultur

nachgewiesen werden (Abb. 10A). Die geringere Menge an HER2/HER3-Heterodimeren in 3D-Kultur hat zugleich eine verringerte Kopräzipitation von PI3K zur Folge (Abb. 10A), da HER3 aufgrund seiner C-terminalen Sequenzbeschaffenheit als bevorzugter Interaktionspartner für PI3K dient (Soltoff et al., 1994; Kim et al., 1994).

Des Weiteren wurde in 3D eine signifikant höhere Menge an den Adapterproteinen Grb2 und Shc kopräzipitiert (Abb. 10A). Beide Adapterproteine werden über spezifische Sequenzmotive direkt an den aktivierten HER2-Rezeptor rekrutiert und aktivieren dadurch im Anschluss den MAPK-Signalweg (Dankort et al., 2001).

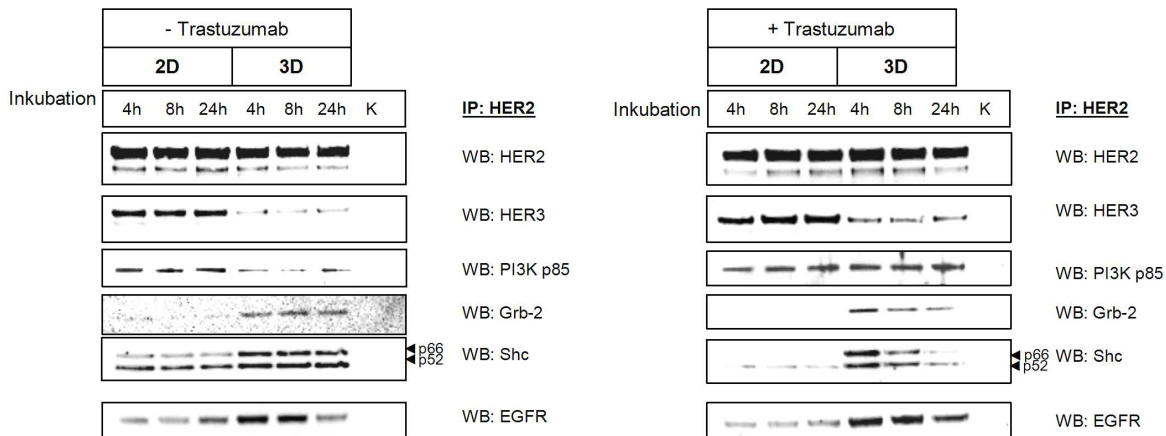
Die Behandlung der Zellen mit 10 µg/ml Trastuzumab hatte keinen Einfluss auf die verringerte HER2/HER3-Heterodimerisierung in 3D-Kultur (Abb. 10A). Jedoch konnte im Verlauf der Inkubation mit Trastuzumab eine signifikante Abnahme an kopräzipitierten Adapterproteinen Shc und Grb2 nachgewiesen werden (Abb. 10A). Diese Beobachtung stützt den zuvor beschriebenen Effekt, dass Trastuzumab in 3D-Kultur die Aktivierung von MEK1/2 und MAPK inhibiert (Abb. 8A).

In 3D wurde sowohl ohne als auch in Gegenwart von Trastuzumab eine transiente Assoziation des HER2-Rezeptors mit EGFR beobachtet, die nur bis zu 24 h nachweisbar war (Abb. 10A).

Die Menge an HER2 in den Zelllysaten wurde vor der Kopräzipitation im Western-Blot überprüft, um so zu gewährleisten, dass in jedem Experiment gleiche Mengen an HER2 präzipitiert werden können (Abb. 10B).

Zusammenfassend zeigte sich, dass HER2 in 3D-Kultur weniger mit HER3 assoziiert als in 2D. Dafür wurden in 3D erhöhte Mengen der MAPK-Adapterproteine Grb2 und Shc kopräzipitiert.

A



B

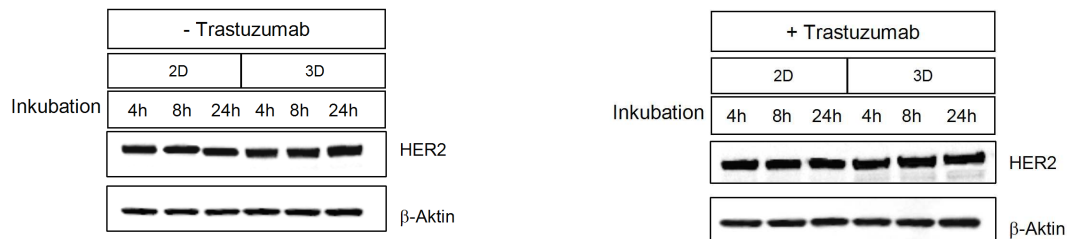


Abb. 10: In 3D-Kultur sind weniger HER2/HER3-Heterodimere nachweisbar. SKBR-3 wurden in 2D- und 3D-Kultur jeweils ohne und in Gegenwart von 10 µg/ml Trastuzumab für 4, 8 und 24 h inkubiert. **A** Western-Blot Analyse der HER2-Präzipitate aus SKBR-3 Zelllysaten. HER2 wurde aus je 120 µg Gesamtzelllysate mittels 35 µl anti-ErbB2 Affibody Molecule® über Nacht präzipitiert. Als Kontrolle (K) wurden 35 µl anti-ErbB2 Affibody Molecule® in Lysepuffer inkubiert. Die Auftrennung der Proteinpräzipitate erfolgte mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. **B** Western-Blot Analyse des Gesamtproteingehalt der normierten Zelllysate vor der HER2-Präzipitation. Hierzu wurden 25 µg Gesamtprotein pro Spur auf ein 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Expression der Proteine HER2 und β-Aktin überprüft.

3.1.4 Lokalisation von HER2 in GM1-angereicherten Lipiddomänen in 3D

Die Dimerisierung von HER2 und die damit verbundene Aktivierung scheint maßgeblich über die Lokalisation des Rezeptors, bzw. seiner Interaktionspartner reguliert zu sein (Nagy et al., 1999; Mocanu et al., 2005). Eine wichtige Funktion, im Hinblick auf die Lokalisation von HER2 auf der Zelloberfläche, haben möglicherweise cholesterinreiche Mikrodomänen („lipid rafts“) innerhalb der Zellmembran. Diese Membrandomänen dienen als Signalplattformen auf der Zelloberfläche und bündeln Rezeptoren, was die Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren, sowie deren Signaltransduktion unterstützt (zusammengefasst in Simons und Toomre, 2000). Bestandteil dieser lipidreichen Membrandomänen sind Sphingolipide und Cholesterin (Simons und Ikonen, 1997). Für die Untersuchung der Lipiddomänen ist vor allem GM1

(Monosialogangliosid-1) von Bedeutung, ein Glycosphingolipid, das die Untereinheit B von Choleratoxin (CTX-B) binden kann und somit als Marker für GM1-angereicherte Membrandomänen dient (Mocanu et al., 2005). Studien mit 2D-Kulturen haben gezeigt, dass die Lokalisation von HER2 in GM1-angereicherten Membrandomänen bei SKBR-3 Zellen sehr instabil ist, da HER2 nach dem Vernetzen der CTX-B markierten Lipiddomänen außerhalb der Membrandomänen lokalisiert (Nagy und Vereb, 2002; Nahta und Esteva, 2006).

Um die Assoziation von HER2 mit Lipiddomänen in 3D-Kultur zu überprüfen wurden SKBR-3 Zellen für 24 h in 3D kultiviert und im Anschluss mit einem CTX-B Alexa 488-Konjugat inkubiert. Zur besseren Visualisierung der CTX-B markierten Lipiddomänen im Mikroskop wurden diese mit einem sekundären Antikörper gegen die Untereinheit B von Choleratoxin vernetzt. Die Markierung des Rezeptors HER2 erfolgte mit Trastuzumab.

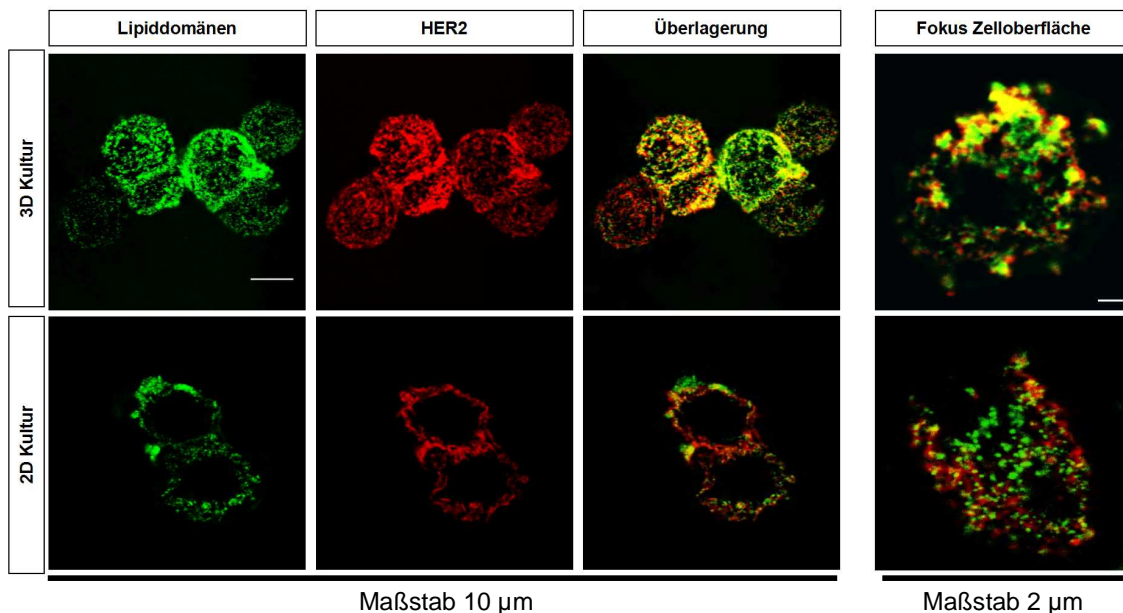


Abb. 11: HER2 ist in 3D-Kultur stabil mit GM1-angereicherten Lipiddomänen assoziiert. Dargestellt ist die Analyse der GM1-angereicherten Lipiddomänen und HER2 im konfokalen Lasermikroskop bei SKBR-3 in 2D- und 3D-Kultur. Um GM1-angereicherte Lipiddomänen nachzuweisen, wurden die Zellen mit dem CT-B Alexa 488-Konjugat (grün) inkubiert und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert. HER2 wurde mit Hilfe von Trastuzumab und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 594 Ziege anti-Human IgG nachgewiesen (rot) und im konfokalen Lasermikroskop beurteilt. Die gelben Bereiche in der Überlagerung repräsentieren die Kolokalisation von HER2 und GM1-angereicherten Lipiddomänen. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 10 µm für die linken sechs Abbildungen und 2 µm die beiden Einzelzellabbildungen rechts.

Die Analyse im konfokalen Lasermikroskop ergab, dass HER2 in 3D-Kultur in GM1-angereicherten Lipiddomänen lokalisiert und auch nach der Vernetzung der Domänen eine stabile Assoziation zeigt, im Gegensatz zur 2D-Kultur (Abb. 11).

Da die Zellen nicht mit Detergenz vorbehandelt wurden, repräsentieren die Bilder (Abb. 11) die Lokalisation von HER2 und GM1 auf der Zelloberfläche.

Dieses Experiment zeigt deutlich, dass HER2 in 3D-Kultur eine stabilere Assoziation mit GM1-angereicherten Lipiddomänen aufweist als in 2D-Kultur. Für die 2D-Kultur konnten die Ergebnisse aus der Literatur bestätigt werden.

3.1.5 Genexpressionsanalyse von SKBR-3 in 2D- und 3D-Kultur

Im Folgenden wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse von 2D- und 3D-Kulturen durchgeführt. Bei der Analyse des Genexpressionsmusters lag der Fokus auf Genen, deren Produkte unmittelbar in Zusammenhang mit Krebs stehen und die potentiell an einer Reorganisation der Zelloberflächenstruktur beteiligt sein könnten. Die Expressionsanalyse erfolgte mit dem Affymetrix GenChip[®] Array HG-U133 Plus 2.0, der die Messung der Expression aller bekannten Gene des humanen Genoms erlaubt. Damit können über 47000 Transkripte und deren Varianten gemessen werden.

Für die Erstellung des Profils wurde in Kooperation mit U. Bär aus den Zellen einer 2D- und 3D-Kultur total RNA isoliert, in cDNA übersetzt und die Transkripte anschließend auf diesem GenChip[®] Array hybridisiert. Das Expressionsprofil der 2D-Kultur repräsentiert die Basislinie, auf deren Grundlage alle Änderungen, die sich im Expressionsprofil der 3D-Kultur ergeben, errechnet wurden. Die Unterschiede, die sich aus diesem 2D-3D-Vergleich ergeben, werden durch sogenannte Änderungsfaktoren dargestellt. Der Vergleich der hybridisierten Transkripte aus den beiden unterschiedlichen Kulturbedingungen ergab, basierend auf den Filterkriterien (siehe Materialien und Methoden), dass in 3D-Kultur die Expression von 163 Genen hochreguliert und die Expression von 80 Genen herunterreguliert war.

Mit Hilfe der Software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) von Ingenuity Systems wurden die aus der Affymetrix-Analyse erhaltenen Datensätze bewertet und abhängig von ihrer biologischen Relevanz verschiedenen Untergruppen zugeordnet. Die Software greift dabei auf Informationen aus wissenschaftlichen Publikationen zurück. Eine dieser Untergruppe repräsentiert die Gene, die in irgendeiner Form in Zusammenhang mit Krebs stehen. Der Datensatz enthält 27 herunterregulierte Gene, die in Zusammenhang mit Krebs stehen (Tab. 1).

Tab. 1: Zusammenfassung der bei SKBR-3 in 3D-Kultur herunterregulierten und in Zusammenhang mit Krebs stehenden Gene. Verglichen wurde die Genexpression von SKBR-3 in 2D- und 3D-Kultur mit Hilfe des Affymetrix GenChip® Array HG-U133 Plus 2.0. Die Änderungen in der Genexpression wurden durch den Änderungsfaktor beschrieben. Mit Hilfe der Software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) wurden die regulierten Gene verschiedenen Gruppen mit definierter biologischer Funktion zugeordnet.

Nr.	Typ	Symbol	Name	Änderungsfaktor	Lokalisation	Gen ID
1	Andere	ANXA1	annexin A1	-1,73	Plasmamembran	301
2		C20ORF27	chromosome 20 open reading frame 27	-1,00	unbekannt	54976
3		CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	-4,77	Plasmamembran	857
4		CDC37	cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)	-1,22	Zytoplasma	11140
5		CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	-1,72	Plasmamembran	8727
6		DLEU1	deleted in lymphocytic leukemia, 1	-1,24	unbekannt	10301
7		HNRPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	-1,06	Nukleus	9987
8		ICAM3	intercellular adhesion molecule 3	-1,00	Plasmamembran	3385
9		IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	-1,79	Extracellular Space	3488
10		LY6D	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	-1,17	Plasmamembran	8581
11		MT1X	metallothionein 1X	-1,18	unbekannt	4501
12		NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	-1,22	Nukleus	4739
13		PEG10	paternally expressed 10	-1,90	Nukleus	23089
14		STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	-1,44	Zytoplasma	10963
15		TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	-1,18	Plasmamembran	51330
16		TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	-2,93	Zytoplasma	7168
17	Enzym	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	-2,36	Zytoplasma	1543
18		HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	-1,09	Zytoplasma	3162
19		PLCE1	phospholipase C, epsilon 1	-2,07	Zytoplasma	51196
20		SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-1,13	Zytoplasma	6648
21		SQLE	squalene epoxidase	-1,07	Zytoplasma	6713
22		TGM1	transglutaminase 1	-1,28	Plasmamembran	7051
23	Wachstumsfaktor	JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)	-1,51	extrazellulär	182
24		PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	-1,08	extrazellulär	5154
25	Transmembranrezeptor	NRP1	neuropilin 1	-1,20	Plasmamembran	8829
26		QLR1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	-5,94	Plasmamembran	4973
27	Transporter	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	-1,54	Plasmamembran	9429

3.1.6 Die Expression von Caveolin-1 ist bei SKBR-3 in 3D-Kultur herunterreguliert

Mit Hilfe der IPA-Software von Ingenuity Systems wurden anschließend die 27 herunterregulierten Gene mit dem Signalnetzwerk von HER2 verglichen. Die Software greift dabei auf alle publizierten Daten über HER2 zurück und ordnet die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse entsprechenden biologischen Subgruppen, z.B. Enzym oder Wachstumsfaktor, zu. Dies lieferte den Hinweis, dass zwischen HER2 und Caveolin-1 eine indirekte Interaktion beschrieben ist.

Caveolin-1 zeigte in der Affymetrix-Analyse einen Änderungsfaktor von -4,77 (Tab. 1, Nr. 3). Das bedeutet, dass in 3D-Kultur nur noch ca. 16% der Caveolin-1 mRNA Menge im Vergleich zur 2D-Kultur detektiert werden konnten (Abb. 12A). Eigene Literaturrecherchen konnten diese Verknüpfung bestätigen. Caveolin-1 ist ein Strukturprotein, das Homooligomere bzw. Heterooligomere mit Caveolin-2 bildet und an der Ausbildung sogenannter Caveolae beteiligt ist. Caveolae sind Invaginationen der Zellmembran und zählen zu einer Subklasse der cholesterinreichen Mikrodomänen der Plasmamembran (Simons und Toomre, 2000). Sie enthalten Cholesterin und Glykosphingolipide und sind involviert in

Endozytose, Zelladhäsion und Signaltransduktion (Couet et al, 1997; Zhang et al, 2000; Razani et al, 2001). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Caveolin-1 eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt, da die Expression von Caveolin-1 in humanen Tumormproben und in onkogen transformierten Zellen stark reduziert ist (Razani und Schlegel, 2001; Sagara et al., 2004; Ravid et al., 2006).

Die Abnahme der Caveolin-1 mRNA Expression in 3D-Kultur wurde mit Hilfe der RT-PCR überprüft und konnte bestätigt werden. Die Menge an Caveolin-1 mRNA in der 3D-Kultur war um den Faktor 4 niedriger als in der 2D-Kultur (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde im Western-Blot untersucht ob die herunterregulierte mRNA Menge mit einer geringeren Proteinexpression von Caveolin-1 korreliert.

Caveolin-1 Protein war in den Zellextrakten der 2D-Kultur nachweisbar (Abb. 12B). Die Menge änderte sich nicht durch die Behandlung der Zellen mit Trastuzumab (Abb. 12B). In 3D-Kultur lag Caveolin-1, wie aus dem vielfach geringeren mRNA-Niveau ableitbar ist, unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 12B).

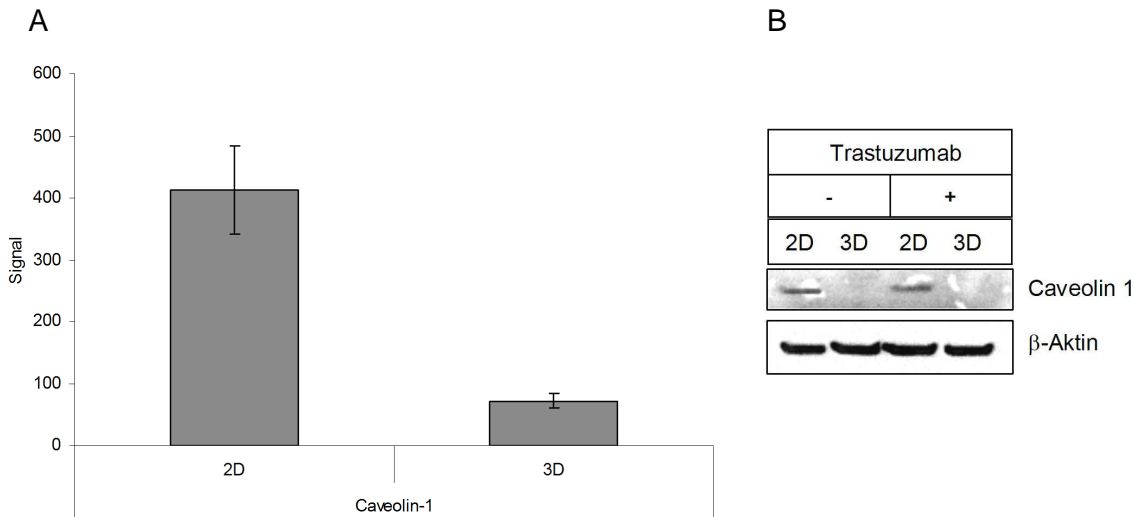


Abb. 12: Caveolin-1 ist bei SKBR-3 in 3D-Kultur herunterreguliert. **A** Gezeigt ist die Caveolin-1 mRNA Expression in 2D- und 3D-Kultur bei SKBR-3. Hierfür wurde die total RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und die cRNA anschließend auf dem Affymetrix GenChip® Array HG-U133 Plus 2.0. hybridisiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Signals aus der GenChip Analyse aus drei Replikaten und die Standardabweichung. **B** Western-Blot Analyse der Caveolin-1 Proteinexpression in 2D und 3D bei SKBR-3 ohne und in Gegenwart von 10 µg/ml Trastuzumab. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Pro Spur wurden 25 µg Gesamtprotein aufgetragen.

3.1.6.1 Vergleich der Caveolin-1 Expression in verschiedenen Krebszelllinien

Nachfolgend stellte sich die Frage, ob die verringerte Caveolin-1 Expression bei SKBR-3 eine Folge der 3D-Zellkultur ist, oder ein zelllinienspezifisches Phänomen widerspiegelt. Die Caveolin-1 Expression wurde deshalb in vier weiteren Krebszelllinien untersucht. Ausgewählt wurde hierfür die Ovarialkrebszelllinien SKOV-3, die HER2 stark überexprimiert und auf die Behandlung mit Trastuzumab *in vitro* anspricht (Abb. 7A) und KPL-4, eine Brustkrebszelllinien, die ebenfalls stark HER2 überexprimiert. Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 und die Epidermoidkrebszelllinie A431 überexprimieren beide EGFR (Lin et al., 2001). Die Zelllinien wurden jeweils in 2D- und 3D-Kultur inkubiert und die Caveolin-1 Expression anschließend im Western-Blot detektiert.

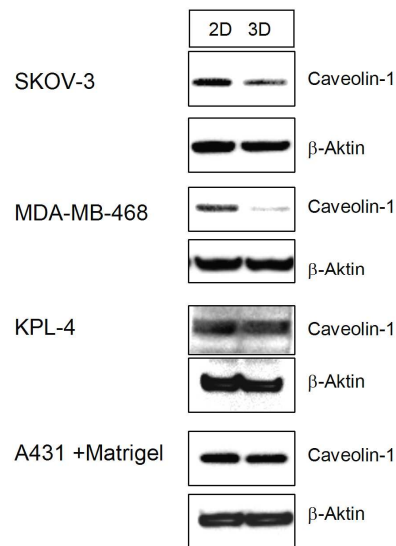


Abb. 13: Western-Blot Analyse der Caveolin-1 Expression in 2D- und 3D-Kultur bei verschiedenen Zelllinien. Die Zelllinien SKOV-3, MDA-MB-468, KPL-4 und A431 wurden 48 h in 2D und 3D kultiviert. Bei der Zelllinie A431 konnte die Ausbildung von Spheroïden nur in Gegenwart von 0,3 µg/µl Matrigel induziert werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Pro Spur wurden bei SKOV-3 und A431 20 µg, bei MDA-MB-468 30 µg und bei KPL-4 40 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Bei den Linien SKOV-3 und MDA-MB-468 war in 3D ebenfalls eine reduzierte Caveolin-1 Expression nachweisbar, im Gegensatz zu KPL-4 und A431 (Abb. 13). Dieses Experiment zeigte, dass die Herunterregulierung von Caveolin-1 kein 3D-Kultur spezifisches Phänomen ist, da KPL-4 und A431 unverändert Caveolin-1 exprimieren. Es bleibt jedoch zu klären, welche Funktion Caveolin-1 in den jeweiligen Linien hat.

3.1.6.2 Die transiente Expression von Caveolin-1 in SKBr3 hemmt die Zellaggregation in 3D-Kultur

Tumorzellen und onkogen transformierte Zellen besitzen die besondere Eigenschaft, unabhängig von Zell-Zell-Kontakt oder Zell-Matrix-Kontakt zu überleben und zu proliferieren (zusammengefasst bei Wang LH, 2004).

Die rekombinante Expression von Caveolin-1 in onkogen transformierten NIH 3T3 Zellen sowie in T47D und MCF-7 Brusttumorzellen verhindert, dass die Zellen in Soft-Agar Experimenten Zellcluster ausbilden (Engelman et al., 1997; Lee et al., 1998; Fiucci et al., 2002). Dies bedeutet, dass Tumorzellen, die Caveolin-1 überexprimieren, die Fähigkeit verlieren Zell-Matrix-unabhängig zu wachsen. Fiucci und Kollegen diskutieren diesen Effekt als Konsequenz einer reduzierten Onkogenaktivierung in Abhängigkeit von der Caveolin-1 Expression (Fiucci et al., 2002). Die reziproke Regulation von Caveolin-1 und HER2 konnte mit MMTV-Neu (mouse mammary tumor virus-Neu) transgenen Mäusen bestätigt werden. Die transgenen Tiere entwickeln Brusttumore aufgrund der Überexpression des HER2-Rezeptors (Bouchard et al., 1989). Im Vergleich zu den Kontrolltieren war in den Tieren, die HER2 induzierte Brusttumore aufwiesen, keine Caveolin-1 Expression mehr nachweisbar (Engelman et al. 1998).

Um die Relevanz von Caveolin-1 bei SKBR-3 in 3D-Kultur zu untersuchen, wurden SKBR-3 Zellen in einer herkömmlichen 2D-Kultur jeweils mit einem Kontrollvektor und einem Vektor, der Caveolin-1 kodiert, transient transfiziert und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf poly-HEMA beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und für 48 h inkubiert.

Im Western-Blot wurde die Expression von Caveolin-1 bestätigt (Abb. 14B). Wie in Abbildung 14A zu sehen ist, unterscheidet sich der 3D-Phänotyp der Caveolin-1 überexprimierenden Zellen stark von dem in den Kontrollexperimenten. Die transiente Expression von Caveolin-1 in 3D-Kultur verhindert die Aggregation der Zellen und die Ausbildung von dreidimensionalen Zellverbänden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Tyrosinphosphorylierung von HER2 in Anwesenheit von Caveolin-1 etwas schwächer ist als bei den Kontrollansätzen (Abb. 14B).

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Zellaggregaten in 3D-Kultur und dem Expressionsstatus von Caveolin-1 und eine damit verbundene Regulation der HER2-Phosphorylierung. Allerdings können KPL-4, trotz Caveolin-1 Expression in 3D-Kultur, auf poly-HEMA beschichteten Zellkulturplatten Spheroide ausbilden (Abb. 8C).

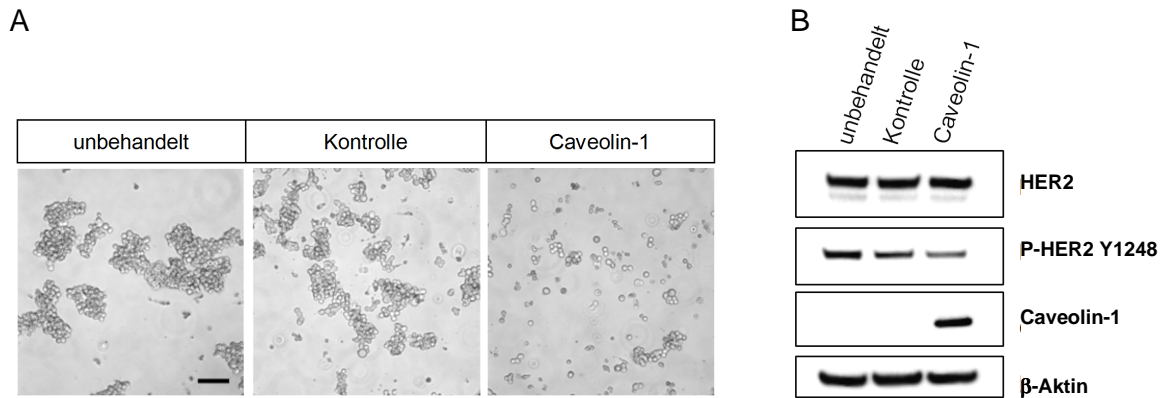


Abb. 14: Die Überexpression von Caveolin-1 in SKBR-3 verhindert die Aggregation der Zellen in 3D-Kultur und interferiert mit der HER2-Phosphorylierung. SKBR-3 wurden 24 h nach Aussaat in 2D-Kultur jeweils mit 10 µg pcMV6-XL5-Caveolin-1 oder 10 µg Leervektor (Kontrolle) transfiziert und für 24 h inkubiert. Als Vergleich dienten unbehandelte SKBR-3 Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit Accutase von den Zellkulturplatten abgelöst und in poly-HEMA beschichtete 6-Napfplatten ausgesät und für weitere 48 h inkubiert. **A** Phasenkontrastaufnahme der SKBR-3 Zellmorphologie nach 48 h Inkubation in 3D-Kultur. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 µm. **B** Western-Blot Analyse der Expression von HER2, phospho-HER2 und Caveolin-1. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Pro Spur wurden 25 µg Gesamtprotein aufgetragen.

3.1.6.4 Die Inhibition der Gangliosid-Biosynthese interferiert mit der Phosphorylierung von HER2 in 3D-Kultur

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass einige Gene bzw. Proteine in 3D-Kultur unterschiedlich exprimiert sind, unter anderem Caveolin-1. Die Vermutung liegt nahe, dass die Zellen in 3D-Kultur ihre Zelloberfläche restrukturieren, was schließlich eine gesteigerte Onkogenaktivierung zur Folge haben könnte.

Wie unter 3.1.4 bereits gezeigt wurde, ist HER2 in 3D vermehrt mit GM1-angereicherten Lipiddomänen assoziiert. Um einen funktionellen Zusammenhang zwischen der HER2-Lokalisation in Lipiddomänen und einer damit verbundenen Rezeptoraktivierung herzustellen, wurde die Biosynthese der Ganglioside mittels (±)-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol Hydrochlorid ([D]-PDMP) inhibiert. [D]-PDMP, ein Ceramidanalogen, ist ein gebräuchlicher Inhibitor der UDP-Glukose Ceramidglukosyltransferase um die Funktion von Gangliosiden zu untersuchen (Radin et al., 1993).

SKBR-3 Zellen wurden in 2D-Kultur mit 5, 30 und 40 µM [D]-PDMP vorbehandelt und anschließend in 3D ausgesät. Die Inhibition der Gangliosid-Biosynthese wurde exemplarisch anhand der GM1 Expression auf der Zelloberfläche überprüft. Hierzu wurden SKBR-3 Zellen nach Inkubation mit 40 µM [D]-PDMP mit CTX-B Alexa 488 gefärbt und im FACS

analysiert. Die Behandlung mit 40 μM [D]-PDMP inhibierte die GM1 Expression auf der Zelloberfläche um 60% (Abb. 15A).

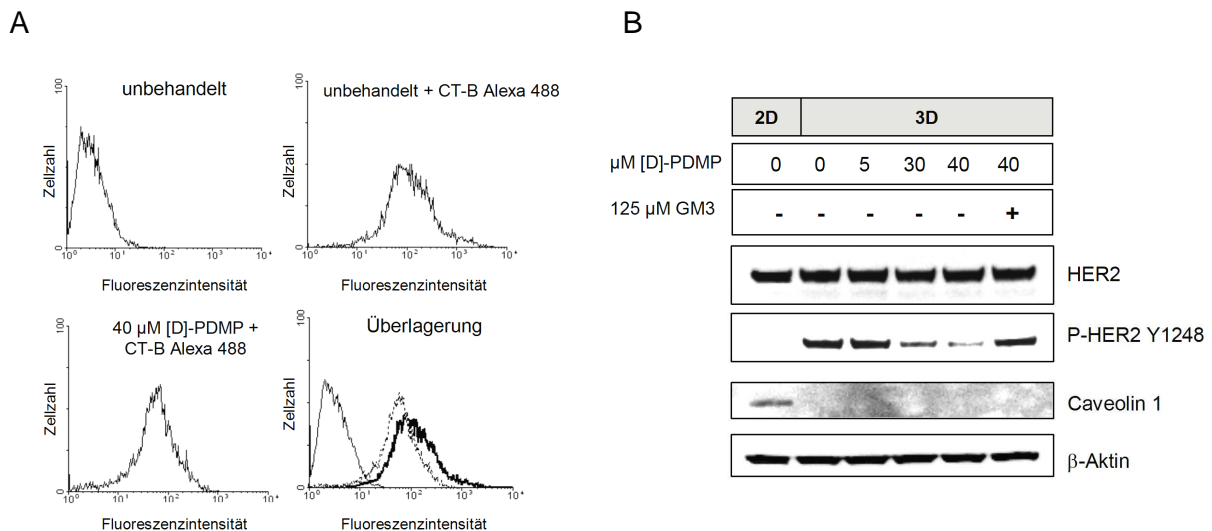


Abb. 15: Die Inhibition der Gangliosid-Biosynthese beeinflusst die Phosphorylierung von HER2. SKBR-3 wurden 24 h nach Aussaat in 2D-Kultur mit 5, 30 und 40 μM [D]-PDMP versetzt und für 4 Tage inkubiert. Als Vergleich dienten unbehandelte SKBR-3 Zellen. **A** Analyse der GM1-Expression im Durchflusszytometer. Nach 4 Tage Inkubation in Gegenwart von 40 μM [D]-PDMP wurde exemplarisch die Expression des Gangliosids GM1 auf der Zelloberfläche überprüft. Hierfür wurden die Zellen mit CT-B Alexa 488-Konjugat inkubiert, im Durchflusszytometer analysiert und die Messung als Histogramm dargestellt (—unbehandelt, —unbehandelt + CT-B Alexa 488,40 μM [D]-PDMP + CT-B Alexa 488). **B** Western-Blot Analyse der Expression von HER2, phospho-HER2 und Caveolin-1. Im Anschluss an die Inkubation in Gegenwart des Inhibitors [D]-PDMP in 2D-Kultur wurden die Zellen mit Accutase von den Zellkulturplatten abgelöst und in poly-HEMA beschichtete 6-Napfplatten ausgesät und für weitere 24 h mit [D]-PDMP inkubiert. Parallel wurden zu einem Ansatz, der mit 40 μM [D]-PDMP inkubiert wurde, gleichzeitig 125 μM Gangliosid GM3 gegeben. Die Proteine wurden mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und als Ladekontrolle diente β -Aktin. Pro Spur wurden 25 μg Gesamtprotein aufgetragen.

Der Einfluss des Inhibitors auf die HER2-Phosphorylierung wurde im Western Blot analysiert. In Abb. 15B ist gezeigt, dass mit zunehmender [D]-PDMP Konzentration das Phosphosignal von HER2 abnimmt. Die Zugabe des Gangliosids GM3 (Monosialogangliosid-3) während der Inkubation in 3D führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von HER2 (Abb. 15B, Spur 6). Durch die Versorgung der Zellen mit exogenem GM3 wird die Depletion der Ganglioside kompensiert, was die Phosphorylierung des HER2 wiederherstellt. Dies belegt den funktionellen Zusammenhang zwischen dem Rezeptor HER2 und seiner Assoziation mit lipidreichen Membrandomänen.

Die Caveolin-1 Expression wurde durch die Behandlung mit [D]-PDMP nicht beeinflusst (Abb. 15B).

3.1.7 Vergleich der HER-Proteinkomplexe in 2D- und 3D-Kultur

Die Ergebnisse aus der Koimmunopräzipitationsstudie mit HER2 hatten gezeigt, dass in 3D-Kultur kaum HER2/HER3-Heterodimere nachzuweisen waren (Abb. 10A). Des Weiteren konnte eine vermehrte Lokalisation von HER2 in GM1-angereicherten Membrandomänen gezeigt werden (Abb. 11) und eine Herunterregulierung von Caveolin-1 in 3D-Kultur (Abb. 12B). Das Fehlen von Caveolae-Strukturen auf der Zelloberfläche könnte die Homo- bzw. Heterodimerisierung der HER-Rezeptoren entscheidend beeinflussen und schließlich auch den Aktivierungsstatus von HER2.

Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob sich die HER2-Homodimerkomplexe und die HER2/HER3-Komplexe einer SKBR-3 2D-Kultur im Sucroседichtegradient anders verhalten als in einer 3D-Zellkultur. Hierfür wurden die gleichen Mengen an Zellen aus den beiden unterschiedlichen Kulturbedingungen geerntet und wie bei der Kopräzipitationsstudie mit Hilfe von 1% Triton X-100, einem nicht-ionischen Detergenz, lysiert. Nach Zentrifugation wurden die normierten Zelllysate mit einem linearen Sucroседichtegradient (5-30%) aufgetrennt.

Die Verwendung von Triton X-100 bei der Lyse von Zellen hat den Vorteil, dass Proteine unter nahezu nativen Bedingungen gehalten werden können und so für Kopräzipitationsstudien zugänglich sind. Jedoch führt die Verwendung von 1% Triton X-100 bei 4°C zu keiner vollständigen Zelllyse im eigentlichen Sinn, da vor allem dicht gepackte, lipidreiche Subdomänen der Zellmembran nicht zugänglich sind für das Detergenz und sich dadurch ein detergenzlöslicher und ein detergenzunlöslicher Anteil bildet (Brown und London, 1998).

Die detergenzunlöslichen bzw. -löslichen Anteile aus den 2D- und 3D-Zelllysaten wurden im linearen Dichtegradient aufgetrennt. Die 12 gesammelten Fraktionen aus dem Dichtegradienten wurden zusammen mit der Zelldebris aus der Zelllyse im Western-Blot auf ihren Gehalt an EGFR, HER2, HER3 und Caveolin-1 untersucht. Zum Vergleich wurden die Proteine Lyn und CD71 nachgewiesen. Lyn ist eine Tyrosinkinase die mit detergenzunlöslichen Membrandomänen assoziiert ist und CD71, ein Transferrinrezeptor, ist mit dem detergenzlöslichen Teil verknüpft.

Prinzipiell sind die Proteinkomplexe, die mit lipidreichen Membrandomänen assoziiert sind, den Fraktionen 1 bis 7 zuzuordnen, da sie die Triton X-100 unlöslichen Komponenten enthalten. CD71 diene hierbei als Markerprotein für den löslichen Anteil (Fraktionen 7-12 in 2D und 8-12 in 3D, Abb. 16).

Besonders auffällig war die Tatsache, dass nur im 2D-Experiment alle drei HER-Rezeptoren in der Zelldebris nachzuweisen waren (Abb. 16, Fraktion „D“). Auch die Expression von Caveolin-1 war erneut nur in der 2D-Kultur zu beobachten (Abb. 16, Fraktion „D“). Es war zu erwarten, dass Caveolae aufgrund ihrer lipidgeichen Membrandomänen schwer löslich in Triton X-100 sind und deshalb anteilig im Zelldebris nachweisbar waren.

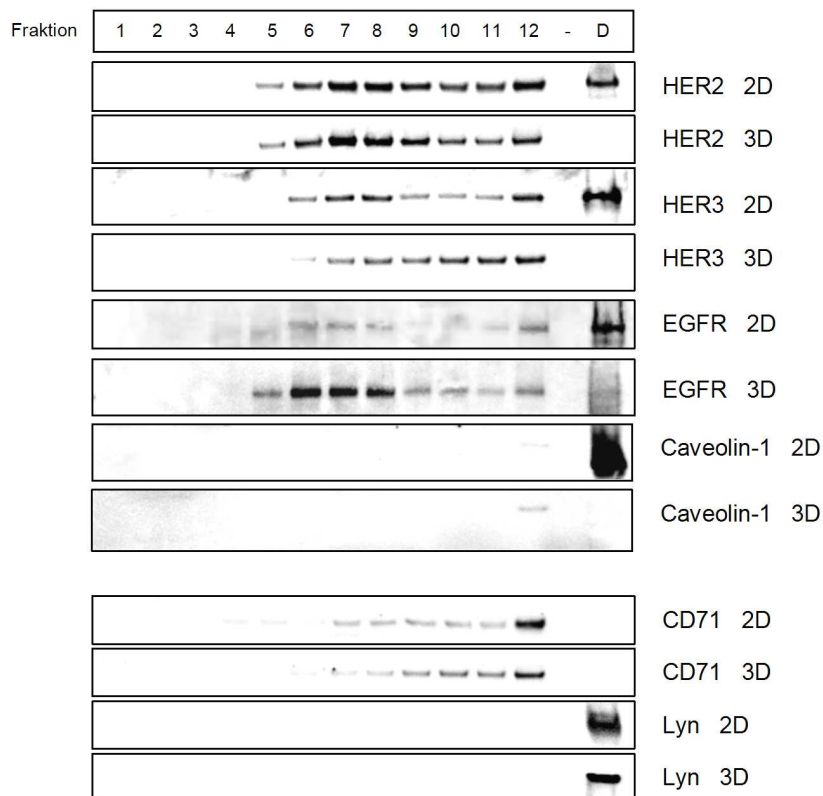


Abb. 16: Auftrennung der HER-Komplexe mit Hilfe eines linearen Sucroседichtegradienten. Western-Blot Analyse der Fraktionen des linearen Sucrosegradienten (5-30%) und der Zelldebris. Die Bezeichnungen 1-12 beschreiben die Fraktionen des Sucrosegradienten und D beschreibt die Zelldebris.

Die Verteilung von HER2 in den Fraktionen 5 bis 12 bei der 3D-Kultur unterscheidet sich nicht signifikant von dem Verteilungsmuster einer 2D-Kultur, doch scheint in den Fraktionen 10 bis 12 in 3D der HER2-Anteil etwas geringer (Abb. 16). HER3 ist ebenfalls in den Fraktionen 6 bis 12 nachweisbar, jedoch ist der Anteil an HER3 in den Fraktionen 6 und 7 in der 3D-Kultur kaum nachweisbar bzw. sehr gering und verlagert sich mehr in die Fraktionen 10-12 (Abb. 16). Auffällig ist die Menge an EGFR die in den Fraktionen 6 bis 8 in der 3D-Kultur detektierbar sind, jedoch nicht in den 2D-Fraktionen (Abb. 16).

Da der HER3-Anteil in den Fraktionen 6 und 7 des 3D-Experiments geringer ist als in 2D, könnte dies bedeuten, dass weniger HER2/HER3-Heterodimere in den lipidreichen Mikrodomänen vorliegen.

3.2 Generierung und Charakterisierung einer Trastuzumab resistenten SKBR-3

Linie *in vitro*

Trotz der initialen Therapieerfolge mit Trastuzumab spricht ein Großteil der behandelten Patienten innerhalb eines Jahres nicht mehr auf die Behandlung mit Trastuzumab an (Cobleigh et al., 1999; Vogel et al., 2002). Die Behandlung von sogenannten erworbenen oder gegebenen Resistenzen während einer Therapie stellt Onkologen vor eine große Herausforderung. Momentan stehen keine verlässlichen klinischen Daten zur Verfügung, um die Therapieerfolge mit Trastuzumab bei HER2-überexprimierenden Brustkrebspatientinnen zu prognostizieren. Erste präklinische Daten aus *in vitro* und *in vivo* Experimenten beschreiben mögliche Mechanismen, die an der Ausbildung einer Resistenz gegen Trastuzumab beteiligt sein könnten (Nahta und Esteva, 2003; Suzuki und Toi, 2007). Die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten beruhen auf herkömmlichen 2D-Zellkultursystemen. Um aber die Vorgänge, bzw. die Veränderungen im Tumor während einer Therapie besser verstehen zu können, sind Zellmodelle, welche die Physiologie des Tumors adäquater reflektieren, unerlässlich.

Das in dieser Arbeit etablierte 3D-Modell zeigt signifikante Unterschiede zur 2D-Zellkultur. Daher sollte nun auch das Problem der Trastuzumabresistenz in diesem Modell untersucht werden.

3.2.1 Generierung einer Trastuzumab resistenten SKBR-3 Linie *in vitro*

3.2.1.1 Selektion der Trastuzumab resistenten SKBR-3 Zellen in 3D-Kultur

Zur Generierung einer Trastuzumab resistenten SKBR-3 Linie wurden die Tumorzellen auf poly-HEMA beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und in Gegenwart von 40 µg/ml Trastuzumab während eines Zeitraums von 8 Wochen selektioniert. Die Zellaggregate wurden ein- bis zweimal pro Woche resuspendiert und in frisches Zellkulturmedium ausgesät. Die nach 8 Wochen verbleibenden Zellen wurden zur Expansion in Zellkulturflaschen ausgesät und permanent in Gegenwart von 10 µg/ml Trastuzumab kultiviert. Diese Zelllinie wird fortan als SKBR-3 HR (SKBR-3 *Herceptin resistant*) bezeichnet.

Ein Aliquot der SKBR-3 HR Linie wurde für 4 Monate ohne den Zusatz von Trastuzumab in 3D kultiviert, um zu überprüfen ob es sich um einen stabilen oder reversiblen Resistenzmechanismus handelt. Zur Expansion wurden die Zellen im Anschluss an die

Selektion ebenfalls in Zellkulturflaschen ausgesät. Diese Zelllinie wird im Folgenden als SKBR-3 HR- bezeichnet.

Beide Zelllinien wurden gezielt aus dem verbleibenden Zellpool etabliert und nicht klonal expandiert, um so besser die Heterogenität eines Tumors widerzuspiegeln. Zudem vermeidet man dadurch die Beschreibung von klonspezifischen Resistenzmechanismen.

Zur Charakterisierung der Spheroidmorphologie wurden jeweils Wildtyp SKBR-3, SKBR-3 HR und SKBR-3 HR- Zellen in poly-HEMA beschichtete 96-Napfplatten ausgesät und für 7 Tage inkubiert. Im Vergleich zu Wildtyp SKBR-3 erscheinen die SKBR-3 HR Spheroiden viel kompakter und bilden kaum Satelliten um die Spheroiden (Abb. 17A).

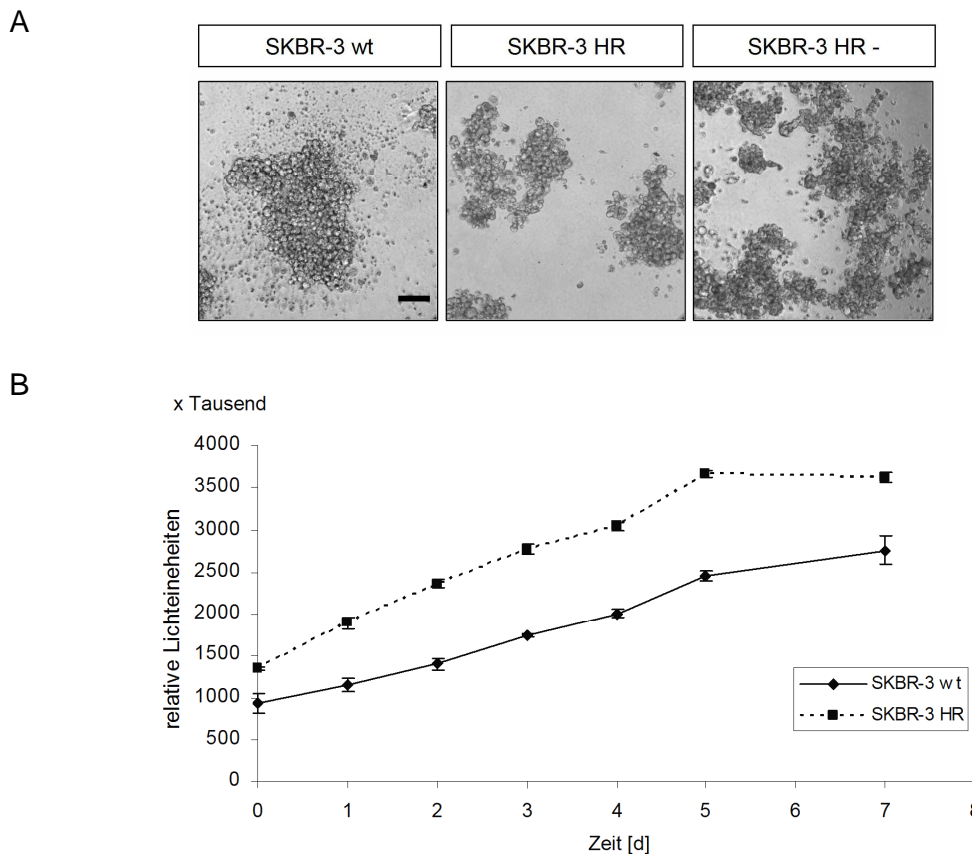


Abb. 17: Vergleich der Zellmorphologie und Proliferation der Trastuzumab resistenten Linie SKBR-3 HR mit der Wildtyplinie. **A** Phasenkontrastanalyse der Zellmorphologie von SKBR-3 wt (Wildtyp), SKBR-3 HR (Trastuzumab resistent) und SKBR-3 HR- (revertierte, erneut Trastuzumab responsive Linie). Die Zellen wurden für 7 Tage in einer poly-HEMA beschichtete 96-Napfplatten kultiviert. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 μ m. **B** Wachstumskurve von SKBR-3 wt und SKBR-3 HR (Trastuzumab resistent). Mittels CellTiter Glo® Reagenz wurde die Zellproliferation, angegeben in relativen Lichteinheiten, gemessen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus fünf Replikaten und die Standardabweichung.

Die mittlere Größe der SKBR-3 HR Zellaggregate ist vergleichbar mit denen der SKBR-3 Zellen. Auch die SKBR-3 HR- bilden sehr kompakte Zellaggregate, jedoch neigen diese Zellen wieder vermehrt dazu, kleine Satelliten um die Spheroide herum auszubilden (Abb. 17A).

In der Wachstumskurve in Abbildung 17B sieht man, dass die Trastuzumab resistente Linie SKBR-3 HR ein zur Ausgangslinie vergleichbares Proliferationsverhalten aufweist. Trotz gleicher Anzahl an ausgesäten Zellen wurde für die SKBR-3 HR Zellen zum Zeitpunkt der Aussaat ein höheres Signal an relativen Lichteinheiten gemessen (Abb. 17B).

3.2.1.2 Induktion einer reversiblen Trastuzumabresistenz in 3D-Kultur

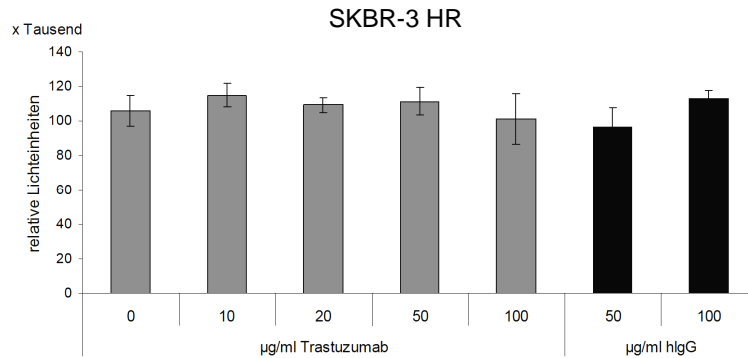
Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die Zellen tatsächlich resistent gegen die Behandlung mit Trastuzumab waren. Die Zellen wurden in Gegenwart von 10, 20, 50 und 100 µg/ml Trastuzumab in 96-Napfplatten für 7 Tage inkubiert und anschließend die Proliferation mittels CellTiter Glo[®] analysiert.

Abbildung 18A zeigt deutlich, dass Trastuzumab auch bei höheren Konzentrationen die Proliferation der Zellen nicht mehr inhibieren kann. Die Linie SKBR-3 HR kann somit als Trastuzumab resistent betrachtet werden.

Im Gegensatz dazu sprechen die SKBR-3 HR-, die für 4 Monate ohne Trastuzumab im Medium kultiviert wurden, erneut auf die Behandlung mit dem therapeutischen Antikörper an (Abb. 18B). Eine konzentrationsabhängige Inhibition der Zellproliferation resultiert auch hier in einer maximalen Proliferationsinhibition von 46%.

Mit Hilfe des hier verwendeten 3D-Modells lässt sich demnach eine Trastuzumabresistenz induzieren, die aber reversibel ist.

A



B

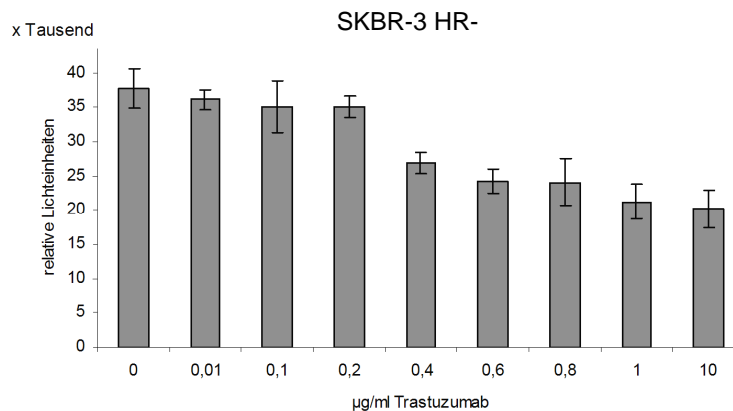


Abb. 18: Trastuzumab inhibiert die Zellproliferation von SKBR-3 HR nicht, jedoch die von SKBR-3 HR-. A Dargestellt ist das Zellwachstum der Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR in Abhängigkeit von der Trastuzumab-Konzentration. Die Zellen wurden in Gegenwart von Trastuzumab, sowie mit einer entsprechenden Isotypkontrolle (hIgG) für 7 Tage inkubiert. Die Messung der Zellproliferation erfolgte mittels CellTiter Glo®. Angegeben ist der Mittelwert der relativen Lichteinheiten aus fünf Replikaten und die Standardabweichung. **B** Konzentrationsabhängige Inhibition von SKBR-3 HR- mit Trastuzumab nach 7 Tagen Inkubation. Angegeben ist der Mittelwert der relativen Lichteinheiten aus fünf Replikaten und die Standardabweichung.

3.2.2 Charakterisierung der Trastuzumab resistenten Zelllinie SKBR-3 HR

3.2.2.1 Zunahme der HER2-Oberflächenexpression bei SKBR-3 HR

Nagy und Kollegen beschrieben eine reduzierte Bindungsaffinität von Trastuzumab gegenüber HER2 bei der Trastuzumab resistenten Zelllinie JIMT-1 (Nagy et al., 2005). Das Glykoprotein Mucin-4 (MUC-4) maskiert den HER2-Rezeptor, so dass Trastuzumab das Epitop nur mehr vermindert binden kann und der Rezeptor dadurch nicht mehr inhibiert wird (Nagy et al., 2005).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Trastuzumab noch immer an den HER2-Rezeptor auf der Zelloberfläche von SKBR-3 HR bindet.

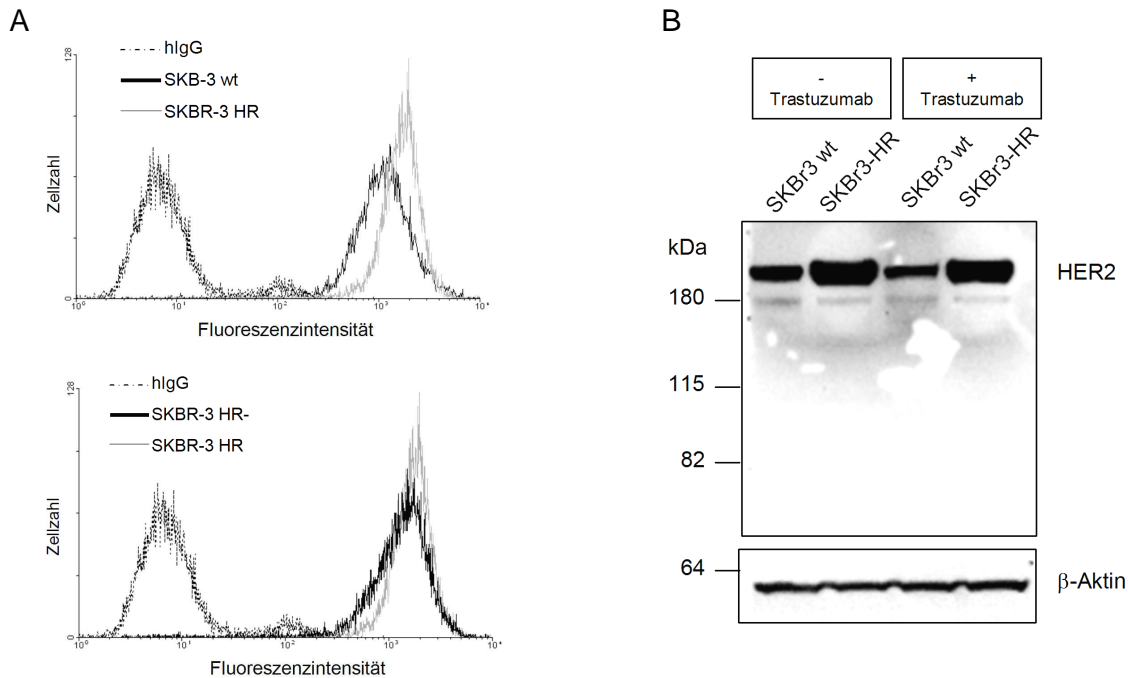


Abb. 19: SKBR-3 HR exprimieren mehr HER2 als die Wildtyplinie SKBR-3. **A** SKBR-3, SKBR-3 HR und SKBR-3 HR- wurden für 48 h in poly-HEMA beschichteten 6-Napfplatten inkubiert. **A** Bestimmung der HER2-Oberflächenexpression im Durchflusszytometer. Die HER2-Expression wurde mittels Inkubation der Zellen mit 20 µg/ml Trastuzumab, gefolgt von der Inkubation mit einem sekundären, Alexa Fluor 488 konjugiertem, Ziege anti-Human IgG im Durchflusszytometer bestimmt. Als Isotypkontrolle diente humanes IgG. **B** Western-Blot Analyse der HER2-Expression bei SKBR-3 und SKBR-3 HR. Die Proteine wurden mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und der Nachweis von HER2 erfolgte mit einem Antikörper, der die C-terminale Domäne von HER2 erkennt. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Pro Spur wurden 25 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Für die Überprüfung der Antikörperbindung wurden SKBR-3 HR, SKBR-3 HR- und Wildtyp Zellen mit 20 µg/ml Trastuzumab auf Eis inkubiert und nach Zugabe eines sekundären, mit Alexa 488 konjugiertem, Antikörper im Durchflusszytometer analysiert. Die Trastuzumab resistente Zelllinie SKBR-3 HR kann mehr Antikörper binden als die Wildtyplinie SKBR-3 (Abb. 19A). Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten so erhöht sich das Signal bei der resistenten Linie um 49%. Die revertierte Linie SKBR-3 HR- hingegen weist im Vergleich zur resistenten ein geringeres Fluoreszenzsignal auf, nämlich nur 77% der Fluoreszenzintensität von SKBR-3 HR (Abb. 19A).

Zusammengefasst bedeutet das, dass die Inkubation der Zellen für 8 Wochen in Gegenwart von Trastuzumab eine Zunahme der HER2-Oberflächenexpression induziert hat. Auf der Zelloberfläche stehen nun mehr HER2-Rezeptoren zur Verfügung, die aktiv die nachgeschalteten Signalwege regulieren könnten. Dass es sich hier um keine Selektion einer Subpopulation handelt, die anfänglich schon mehr HER2 exprimierte, zeigt die Tatsache, dass bei den SKBR-3 HR- Zellen eine geringere Menge an HER2 auf der Zelloberfläche

nachweisbar war. Es scheint sich hier also tatsächlich um einen Trastuzumab vermittelten Effekt zu handeln.

Zusätzlich wurde die HER2-Expression im Gesamtzelllysat im Western-Blot überprüft. Für den Nachweis wurde ein Detektionsantikörper gegen HER2 benutzt, der den C-terminalen Teil des Rezeptors erkennt. Anlass dafür gaben Studien die ein vermehrtes Auftreten eines 95 kDa großen HER2-Fragments (p95HER2) in humanen Brusttumoren zeigten, das partiell auch in einigen Zelllinien nachweisbar war (Molina et al., 2002; Anido et al., 2006; Sáez et al., 2006). Diese verkürzte, intrazelluläre HER2-Variante ist membranassoziiert, besitzt Kinaseaktivität und bildet aktivierte Heterodimerkomplexe mit dem Rezeptor HER3, jedoch nicht mit EGFR (Molina et al., 2001; Xia et al., 2004). Für Trastuzumab ist dieses p95-Fragment nicht zugänglich und kann somit auch nicht dessen Kinaseaktivität inhibieren.

Mit Hilfe der Western-Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass die Linie SKBR-3 HR deutlich mehr HER2-Protein exprimiert als die Wildtyp Linie (Abb. 19B). Eine p95HER2-Variante, sowie andere C-terminale Fragmente, konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 19B).

Um auszuschließen, dass durch die Selektion mit Trastuzumab Mutationen in HER2 induziert wurden, oder dass eine Subpopulation, die eine mutierte Form des Rezeptors enthält, angereichert wurde, erfolgte die Sequenzierung von HER2 (4624 bp). Dazu wurde die RNA extrahiert, anschließend in cDNA transkribiert und mittels PCR mit Fragment-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Die aufgereinigten Amplifikate wurden schließlich sequenziert. Bei der Sequenzierung konnten keine Mutationen des HER2-Rezeptors festgestellt werden, d.h. SKBR-3 HR Zellen exprimieren ein erhöhtes Maß an Wildtyp-Rezeptor.

3.2.2.2 Genexpressionsanalyse von SKBR-3 HR und SKBR-3 in 3D-Kultur

Im Folgenden wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse von SKBR-3 HR und SKBR-3 durchgeführt. Ziel war es Gene zu identifizieren, die möglicherweise in Zusammenhang mit einer Resistenz gegen Trastuzumab stehen könnten.

Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit U. Bär die total RNA aus den Sphroiden von SKBR-3 und SKBR-3 HR isoliert, in cDNA übersetzt und die Transkripte anschließend mit Hilfe des Affymetrix GenChip[®] Array HG-U133 Plus 2.0 analysiert. Die Auswertung der Daten ergab, dass bei der Zelllinie SKBR-3 HR im Vergleich zur Wildtyp Linie die Expression von 790 Genen hochreguliert und die Expression von 654 Genen herunterreguliert war. Mit Hilfe der Software Ingenuity Pathways Analysis von Ingenuity Systems konnten die Gene spezifischen

Clustern zugeordnet und beschrieben werden. Im Fokus lag hier die Subgruppe, die alle Gene filtert, welche in Zusammenhang mit Krebs stehen. Von den 790, deren Genprodukt hochregulierten war, konnten demnach 121 Gene in dieses Cluster eingeordnet werden (Tab. 2).

3.2.2.3 Identifizierung von DARPP-32 als potentiellen Resistenzmarker

Ein detaillierter Vergleich der 121 krebsassoziierten Gene mit Literaturdaten in Bezug auf HER2 lenkte die Aufmerksamkeit auf PPP1R1B (Tab. 2, Nr. 87), auch bekannt als DARPP-32 (*dopamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein*). Die Menge an DARPP-32 war in den Trastuzumab resistenten Zellen mit einem Änderungsfaktor von 40 signifikant erhöht (Tab. 2, Nr. 87). Das Interessante an DARPP-32 ist, dass sich das Gen sowohl bei humanen Brusttumorproben als auch bei gastrointestinalen Adenokarzinomen im HER2-Amplikon, in der Region 17q12-q21 befindet und dadurch auf genetischer Ebene mit HER2 koamplifiziert ist (Kauraniemi und Kallioniemi, 2006; Maqani et al., 2006). Da die Größe des HER2-Amplikons innerhalb der Individuen bzw. Zelllinien variieren kann, haben Kauraniemi und Kollegen im Fall der Zelllinie SKBR-3 gezeigt, dass DARPP-32 hier eindeutig in der Region 17q12-q21 lokalisiert und somit amplifiziert ist (Kauraniemi et al., 2001).

Tab. 2: Zusammenfassung der bei SKBR-3 HR in 3D-Kultur hochregulierten und in Zusammenhang mit Krebs stehenden Gene. Verglichen wurde die Genexpression von SKBR-3 und SKBR-3 HR in 3D-Kultur mit Hilfe des Affymetrix GenChip® Array HG-U133 Plus 2.0. Mit Hilfe der Software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) wurden die regulierten Gene verschiedenen Gruppen mit definierter biologischer Funktion zugeordnet.

	Typ	Symbol	Name	Änderungsfaktor	Lokalisation	Gene ID
1		CCND1	cyclin D1	1,01	Nukleus	595
2		LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)	1,01	extrazellulär	3964
3		S100A4	S100 calcium binding protein A4	1,06	Zytoplasma	6275
4		CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	1,11	Plasmamembran	960
5		CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein	1,11	Plasmamembran	966
6		CDCP1	CUB domain containing protein 1	1,13	Plasmamembran	64866
7		FHL2	four and a half LIM domains 2	1,15	Nukleus	2274
8		VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein	1,15	Plasmamembran	7408
9		NOL3	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	1,17	Nukleus	8996
10		IER3	immediate early response 3	1,21	Zytoplasma	8870
11		FTL	ferritin, light polypeptide	1,24	Zytoplasma	2512
12		WASF2	WAS protein family, member 2	1,33	Zytoplasma	10163
13		MLF1	myeloid leukemia factor 1	1,34	Nukleus	4291
14		HRASLS3	HRAS-like suppressor 3	1,46	Nukleus	11145
15		MYO6	myosin VI	1,55	Zytoplasma	4646
16		MIB1	mindbomb homolog 1 (Drosophila)	1,62	unbekannt	57534
17		RBL2	retinoblastoma-like 2 (p130)	1,84	Nukleus	5934
18		MTBP	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse) binding protein, 104kDa	1,97	unbekannt	27085
19		TMEM87	transmembrane protein 87	2,10	extrazellulär	27346
20		TMSB4X	thymosin, beta 4, X-linked	2,18	Zytoplasma	7114
21	Andere	LOC152485	hypothetical protein LOC152485	2,18	unbekannt	152485
22		RPL5	ribosomal protein L5	2,22	Zytoplasma	6125
23		TNFAIP8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	2,43	Zytoplasma	25816
24		CSTA	cystatin A (stefin A)	2,54	Zytoplasma	1475
25		DOB2	damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	2,93	Nukleus	1643
26		DMD	dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types)	2,99	Plasmamembran	1756
27		MLPH	melanophilin	3,68	Zytoplasma	79083
28		EMP1	epithelial membrane protein 1	3,83	Plasmamembran	2012
29		SPRY4	sprouty homolog 4 (Drosophila)	3,95	Plasmamembran	81848
30		SIPA1	signal-induced proliferation-associated gene 1	3,96	Zytoplasma	6494
31		LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	4,99	extrazellulär	3956
32		SCIN	scinderin	5,07	Zytoplasma	85477
33		ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	6,15	Plasmamembran	3689
34		ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	6,30	Plasmamembran	214
35		CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	8,08	Plasmamembran	4680
36		PSCA	prostate stem cell antigen	8,44	Plasmamembran	8000
37		ARHGDIb	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	9,52	Zytoplasma	397
38		PROM1	prominin 1	9,75	Plasmamembran	8842
39		MGP	matrix Gla protein	295,59	extrazellulär	4256
40		PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	1,07	Zytoplasma	9060
41		PCYT1B	phosphate cytidylyltransferase 1, choline, beta	1,18	Zytoplasma	9468
42		SDHC	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein, 15kDa	1,18	Zytoplasma	6391
43		IBRDC2	IBR domain containing 2	1,20	unbekannt	255488
44		GGT1	gamma-glutamyltransferase 1	1,22	Zytoplasma	2678
45		NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	1,22	Zytoplasma	1728
46		PTGES	prostaglandin E synthase	1,31	Zytoplasma	9536
47		GSS	glutathione synthetase	1,34	Zytoplasma	2937
48		RNASEL	ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)	1,56	Zytoplasma	6041
49		MPI	mannose phosphate isomerase	1,70	Zytoplasma	4351
50		GPX2	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	1,84	Zytoplasma	2877
51		GNAS	GNAS complex locus	2,39	Plasmamembran	2778
52		GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	2,54	extrazellulär	2878
53		GLUL	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	2,88	Zytoplasma	2752
54		CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	2,92	Zytoplasma	1573
55		RERG	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	3,06	Nukleus	85004
56		FUT3	fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group)	3,92	Zytoplasma	2525
57		EHADH	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	4,05	Zytoplasma	1962
58		GSTT1	glutathione S-transferase theta 1	4,17	Zytoplasma	2952
59		PLA2G2A	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	4,98	extrazellulär	5320
60		AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2	7,48	Zytoplasma	1646
61		PRODH	proline dehydrogenase (oxidase) 1	8,05	Zytoplasma	5625
62		AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1	10,14	Zytoplasma	1645
63		RNASE1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	14,05	extrazellulär	6035
64		TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase	14,32	Zytoplasma	6999
65		GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	19,42	Zytoplasma	2745
66		PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	27,10	Zytoplasma	5742
67		GSTP1	glutathione S-transferase pi	29,27	Zytoplasma	2959
68		PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	48,76	Zytoplasma	5321
69		PTAFR	platelet-activating factor receptor	1,12	Plasmamembran	5724
70	G-Protein gekoppelter Rezeptor	PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	1,49	Plasmamembran	5734
71		ADORA1	adenosine A1 receptor	2,27	Plasmamembran	134
72		KISS1R	KISS1 receptor	11,83	Plasmamembran	84634
73	Ionenkanal	ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1	7,42	Zytoplasma	3708
74		CLCA2	chloride channel, calcium activated, family member 2	22,00	Plasmamembran	9635
75		BCR	breakpoint cluster region	1,19	Zytoplasma	613
76		PIK3CD	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide	1,71	Zytoplasma	5293
77		PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	2,44	Zytoplasma	5295
78		EPHA2	EPH receptor A2	2,67	Plasmamembran	1969
79		CDK6	cyclin-dependent kinase 6	6,38	Nukleus	1021
80		PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	8,15	Nukleus	10769
81	Ligandenabhängiger Kernrezeptor	RARA	retinoic acid receptor, alpha	3,98	Nukleus	5914
82		EPHX1	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	1,12	Zytoplasma	2052
83		CTSH	cathepsin H	1,14	Zytoplasma	1512
84		CAPN1	calpain 1, (mu/l) large subunit	1,15	Zytoplasma	823
85		CAST	calpastatin	1,53	Zytoplasma	831
86	Phosphatase	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	18,34	Zytoplasma	1848
87		PPP1R1B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B (dopamine and cAMP regulated phosphopr	40,01	Zytoplasma	84152
88		PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1	1,01	Nukleus	5087
89		C19ORF2	chromosome 19 open reading frame 2	1,11	Nukleus	8725
90		ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	1,12	Nukleus	3397
91		FOXO3A	forkhead box O3A	1,24	Nukleus	2309
92		AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	1,27	Nukleus	4299
93		PCAF	p300/CBP-associated factor	1,31	Nukleus	8850
94		BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	1,38	Nukleus	602
95		HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa	1,42	Nukleus	10553
96		BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	1,46	Nukleus	604
97	Transkriptionsregulator	EID1	EP300 interacting inhibitor of differentiation 1	1,54	Nukleus	23741
98		KLF2	Kruppel-like factor 2 (lung)	1,58	Nukleus	10365
99		TOB1	transducer of ERBB2, 1	1,59	Nukleus	10140
100		TFAP2A	transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	1,65	Nukleus	7020
101		PITX1	paired-like homeodomain transcription factor 1	3,62	Nukleus	5307
102		GATA3	GATA binding protein 3	8,17	Nukleus	2625
103		SHLH2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	8,74	Nukleus	8553
104		HOXC10	homeobox C10	11,84	Nukleus	3226
105		SMARCA2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member	26,49	Nukleus	6595
106		SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	27,52	Nukleus	6662
107	Transmembranrezeptor	TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFkB activator	1,32	Plasmamembran	8792
108		CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	2,39	Plasmamembran	1439
109		PTCH1	patched homolog 1 (Drosophila)	2,73	Plasmamembran	5727
110		LEPR	leptin receptor	3,12	Plasmamembran	3953
111		LDLR	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	1,67	Plasmamembran	3949
112		LCN2	lipocalin 2 (oncogene 24p3)	2,45	extrazellulär	3934
113	Transporter	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	2,75	Plasmamembran	5243
114		CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	5,29	Zytoplasma	1382
115		SLC16A5	solute carrier family 16, member 5 (monocarboxylic acid transporter 6)	7,48	Plasmamembran	9121
116		APOD	apolipoprotein D	14,46	extrazellulär	347
117		FOLR1	folate receptor 1 (adult)	17,48	Plasmamembran	2348
118	Wachstumsfaktor	PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	1,97	extrazellulär	5155
119		EGF	epidermal growth factor (beta-urogastrone)	2,48	extrazellulär	1950
120	Zytokin	FAM3B	family with sequence similarity 3, member B	20,05	extrazellulär	54097
121		SCGB3A1	secretoglobin, family 3A, member 1	48,31	extrazellulär	92304

DARPP-32 ist ein 32 kDA großes, cytoplasmatisches Protein. Die Beteiligung von DARPP-32 an neuronalen Signalwegen, wie dem Dopaminsignalweg im Gehirn, wurde bisher ausführlich erforscht (zusammengefasst in Reis et al., 2007; Svenningsson et al., 2004). Eine funktionelle Relevanz von DARPP-32 in Bezug auf die Tumorentstehung wurde erstmals von El-Rifai und Kollegen diskutiert (El-Rifai et al., 2002). Sie konnten in Magenkarzinomen die Überexpression von DARPP-32, sowie die der verkürzten Form t-DARPP, auf mRNA- und Proteinebene nachweisen, jedoch nicht in normalen Magenepithelzellen. t-DARPP mRNA ist zwischen Exon 2 bis 7 komplementär zu DARPP-32 und unterscheidet sich nur in der Sequenz des ersten Exons. Mittlerweile konnte eine Überexpression von DARPP-32 auch in Adenokarzinomen der Brust, der Prostata und des Kolon nachgewiesen werden (Wang et al., 2005; Kauraniemi und Kallioniemi, 2006; Maqani et al., 2006).

Die Hinweise aus der Literatur und die Tatsache, dass die DARPP-32 Expression bei den Trastuzumab resistenten Zellen induziert werden konnte, lenkte den Fokus in dieser Arbeit weiter auf das Molekül DARPP-32 und seine Bedeutung bei der Resistenzentwicklung gegen Trastuzumab.

3.2.2.4 Überprüfung der DARPP-32 Expression und Lokalisation

Die DARPP-32 mRNA war in den Trastuzumab resistenten Zellen um den Faktor 40 hochreguliert (Tab. 2, Abb. 20A). In einem unabhängigen Experiment sollte die DARPP-32 mRNA Expression mittels RT-PCR bestätigt werden. Hierzu wurde erneut total mRNA aus Sphroiden isoliert, in cDNA übersetzt und mit spezifischen Oligonukleotiden ein DARPP-32 Fragment amplifiziert. Die qualitative Analyse der RT-PCR ergab, dass in den SKBR-3 HR die mRNA Expression von DARPP-32 signifikant erhöht war und bestätigt somit das Ergebnis der Affymetrix-Analyse (Abb. 20B). Parallel dazu wurde die DARPP-32 mRNA Expression in der revertierten Linie SKBR-3 HR- untersucht. Wie in Abbildung 20B gezeigt ist nimmt die mRNA Expression nur geringfügig ab.

Anschließend wurde die DARPP-32 Proteinexpression im Western-Blot überprüft. Es zeigte sich, dass die erhöhte mRNA Expression mit einer Zunahme der DARPP-32 Proteinexpression korreliert (Abb. 20C). In der resistente Linie SKBR-3 HR sind signifikante Mengen an DARPP-32 und t-DARPP exprimiert (Abb. 20C).

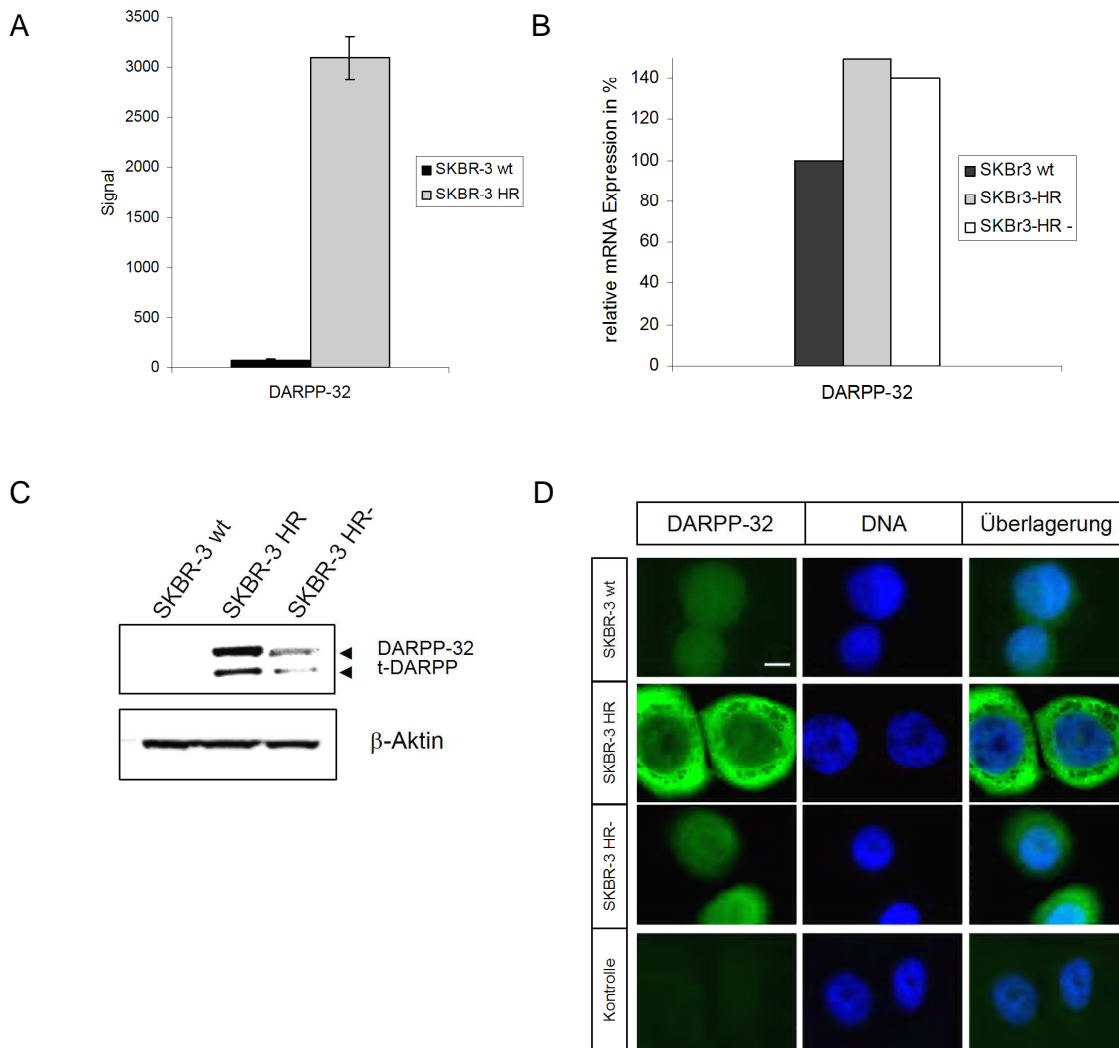


Abb. 20: Überprüfung der DARPP-32 Expression und zellulären Lokalisation. **A** Gezeigt ist die DARPP-32 mRNA Expression bei SKBR-3 wt und SKBR-3 HR in 3D-Kultur. Hierfür wurde die total RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und die cDNA anschließend auf dem Affymetrix GenChip® Array HG-U133 Plus 2.0. hybridisiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Signals aus der GenChip Analyse aus drei Replikaten und die Standardabweichung. **B** Die relative DARPP-32 mRNA Expression bei SKBR-3 HR und SKBR-3 HR- wurde aus den „crossing points“ der RT-PCR Kurven berechnet und auf das Expressionsniveau von SKBR-3 wt (100%) bezogen. Die Analyse der DARPP-32 mRNA erfolgte mittels RT-PCR nach 48 h Kultivierung der Zellen in 3D. **C** Western-Blot Analyse der DARPP-32 Proteinexpression bei SKBR-3 wt, SKBR-3 HR und SKBR-3 HR-. Die Zellen wurden für 48 h in 3D kultiviert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Pro Spur wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen. **D** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von DARPP-32 (grün) bei SKBR-3 wt, SKBR-3 HR und SKBR-3 HR-, auf Deckgläschen in 2D-Kultur ausgesät und 24 h inkubiert. Die DNA wurde mit 1 μ g/ml DAPI gefärbt (blau). Der eingezeichnete Maßstab entspricht 20 μ m.

Die DARPP-32 und t-DARPP Proteinexpression nimmt in der revertierten Linie SKBR-3 HR- wieder ab (Abb. 20C). Demnach müssen die mRNA Expression von DARPP-32 und die Proteinexpression in der Zelllinie SKBR-3 HR- unabhängig reguliert sein, da zuvor in SKBR-3 HR- die mRNA von DARPP-32 nachgewiesen werden konnte (Abb. 20B). Die

Herunterregulierung von DARPP-32 Protein in SKBR-3 HR- weist darauf hin, dass das Protein in Abhängigkeit von Trastuzumab reguliert wird. Demnach kann auch ausgeschlossen werden, dass eine Subpopulation an DARPP-32-exprimierenden Zellen selektioniert wurde.

Zusammengefasst kann man sagen, dass die genetische Amplifikation von *DARPP-32* in SKBR-3 wt zu keiner Expression auf mRNA- und Proteinebene führt. Erst die Behandlung der Zellen mit Trastuzumab über mehrere Wochen induziert die mRNA- und Proteinexpression.

Es ist bekannt, dass DARPP-32 im Gehirn mit einer Reihe von cytoplasmatischen und membranassoziierten Zielmolekülen interagiert und diese reguliert (Greengard, 2001). Auch in Tumorzellen und -geweben konnte die subzelluläre Lokalisation von DARPP-32 im Zytoplasma und an der Zellmembran nachgewiesen werden (Ebihara et al., 2004; El-Rifai et al., 2002). Um die Lokalisation von DARPP-32 in den hier verwendeten SKBR-3 Linien zu untersuchen, wurden die Zellen auf Objekträgern fixiert, mit einem DARPP-32 spezifischen Antikörper, der die C-terminale Domäne von DARPP erkennt, gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. DARPP-32 konnte eindeutig in den SKBR-3 HR Zellen nachgewiesen werden (Abb. 20D). Das Protein lokalisiert vorwiegend im Zytoplasma und eine spezifische Membranassoziation konnte nicht abgeleitet werden. Aufgrund des verwendeten Antikörpers konnten DARPP-32 und t-DARPP jedoch nicht voneinander unterschieden werden.

3.2.2.5 Aktivierung von HER2 und HER3 in Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR und Zunahme der Akt-Kinase-Phosphorylierung

Die Affymetrixanalyse liefert zwar verlässliche Hinweise auf die Expressionsmuster von bestimmten Genen in der resistenten SKBR-3 HR Linie, jedoch gibt sie keinerlei Auskunft über den Expressions- und Aktivierungszustand der korrespondierenden Proteine. Deshalb wurde im Western-Blot das Phosphorylierungsmuster der HER-Familienmitglieder und der wichtigsten assoziierten Signalweiterleitungswege, der MAPK-Weg und der PI3K/Akt-Weg, untersucht. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit und ohne 10 µg/ml Trastuzumab für 48 h in 3D-Kultur inkubiert und die Zelllysate anschließend analysiert.

Die Zunahme der HER2-Expression in den Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR konnte erneut bestätigt werden (Abb. 21A). In Folge der erhöhten HER2-Expression nimmt auch das Phosphosignal des Tyrosinrests 1248 signifikant zu, kann aber durch die Behandlung mit Trastuzumab nachweisbar inhibiert werden (Abb. 21A). Das nach der

Trastuzumabbehandlung verbleibende Phosphosignal ist im Vergleich jedoch immer noch höher als das Basissignal von Phospho-HER2 bei SKBR-3 (Abb. 21A), so dass eine Signalweiterleitung nach wie vor gegeben ist. Der Rezeptor HER3 ist in den SKBR3-HR stärker exprimiert und phosphoryliert als in der Wildtypelinie (Abb. 21A). Mit Trastuzumab ändert sich der Grad der Phosphorylierung nicht (Abb. 21A). Die Menge an exprimiertem und aktiviertem EGFR ändert sich in der resistenten Linie nicht (Abb. 21A). Im Vergleich dazu ist die Expression von EGFR in der erneut responsiven Linie SKBR-3 HR- hochreguliert und korreliert mit einer erhöhten Phosphorylierung, die mit Trastuzumab inhibiert wurde (Abb. 21A).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass bei der Trastuzumab resistenten Linie SKBR-3 HR die Proteinexpression von HER2 und HER3 deutlich hochreguliert ist. Ein Teil der HER2-Rezeptoren wird scheinbar auch immer noch von Trastuzumab inhibiert, was durch die reduzierte Phosphorylierung von HER2 gezeigt wurde. Die Proliferation der Zellen wird jedoch nicht durch die Behandlung von Trastuzumab beeinflusst. Dass der therapeutische Antikörper an den Rezeptor HER2 binden kann, wurde bereits unter 3.2.2.1 gezeigt.

Nachfolgend wurden die nachgeschalteten Signalwege von HER2 überprüft. Das Expressionsniveau von Akt ist bei allen Zelllinien unverändert (Abb. 21B). Im Vergleich dazu ist die Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473 bei SKBR-3 HR stark erhöht (Abb. 21B). Das Akt Phosphosignal nimmt in der responsiven Linie SKBR-3 HR- wieder ab (Abb. 21B). Im Fall von SKBR-3 HR beeinträchtigt die Behandlung mit Trastuzumab nicht die Stärke des Akt Phosphosignals, anders als bei SKBR-3 HR-, wo eine leichte Abnahme des Signals erkennbar ist (Abb. 21B).

Um festzustellen, ob die Aktivierung der Akt Kinase in Relation zu einer veränderten PI3-Kinase Expression steht, wurde die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K im Western-Blot beurteilt. Wie Abbildung 21B zu entnehmen ist, korreliert die erhöhte Expression von PI3K p85 mit einer verstärkten Phosphorylierung von Akt. Die Überprüfung der Genexpressionsdaten aus der Affymetrixanalyse zeigten außerdem, dass die mRNA Expression von p85 in den resistenten Zellen um den Faktor 2,44 hochreguliert ist (Tab. 2, Nr. 77). Das Genexpressionsprofil lieferte zudem den Hinweis, dass es keine abweichenden Unterschiede in der mRNA Expression von EGFR, HER2 und HER3 gab (Daten nicht gezeigt).

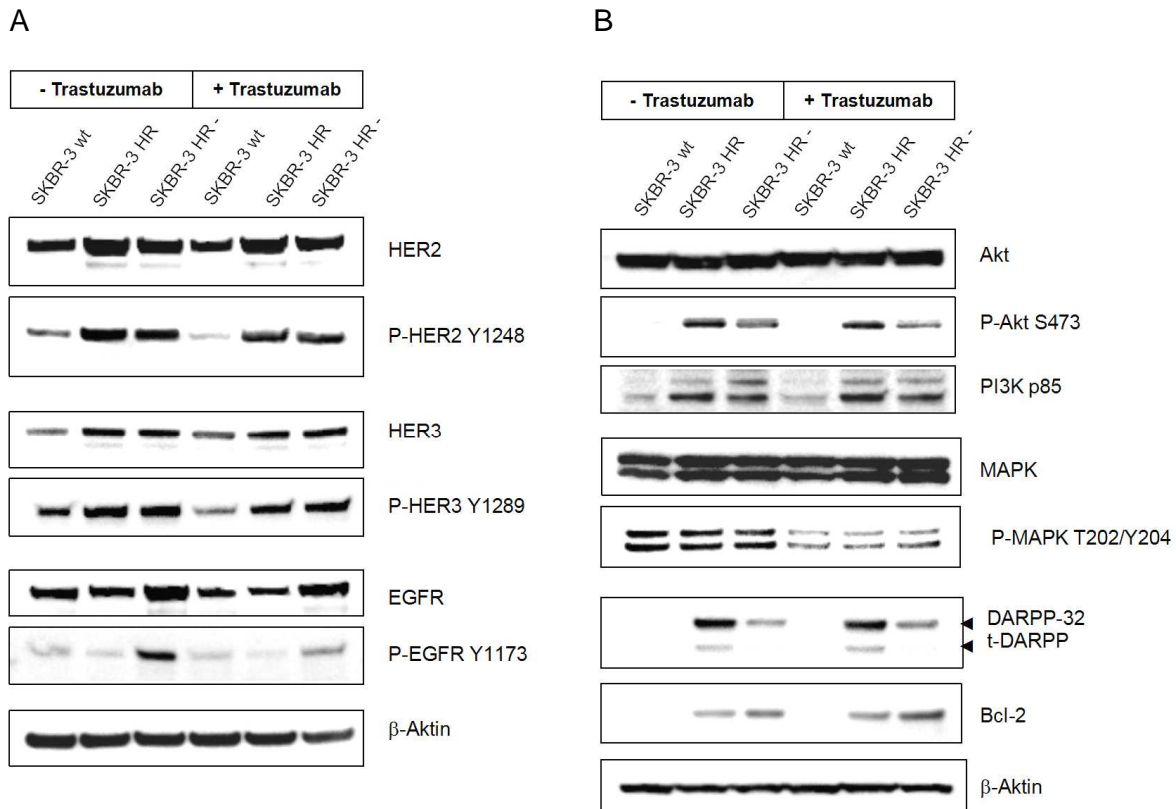


Abb. 21: HER2 und HER3 sowie der PI3K/Akt-Weg sind in der Trastuzumab resistenten Linie SKBR-3 HR verstärkt aktiviert. SKBR-3 wt, SKBR-3 HR und SKBR-3 HR- wurden auf poly-HEMA beschichtete 6-Napfplatten ausgesät. Vor Aussaat der SKBR-3 HR in 3D-Kultur wurden die Zellen passagiert und 48 h ohne Zusatz von Trastuzumab in 2D vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen in 3D für 48 h ohne und mit 10 μ g/ml Trastuzumab. Die Proteine wurden mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Pro Spur wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen. **A** Western-Blot Analyse von HER2, HER3, EGFR und deren Proteinphosphorylierung. **B** Western-Blot Analyse der nachgeschalteten Signalwege PI3K/Akt und MAPK, sowie Expression von DARPP-32, t-DARPP und Bcl-2.

Bei der Phosphorylierung von MAPK waren keine Unterschiede festzustellen (Abb. 21B). Alle Zelllinien reagieren auf die Behandlung mit 10 μ g/ml Trastuzumab mit einer Inhibition des MAPK Phosphosignals (Abb. 21B).

Die Expression von DARPP-32 und t-DARPP wird durch Trastuzumab nicht beeinflusst (Abb. 21B). Um den funktionellen Zusammenhang von DARPP-32 bzw. t-DARPP mit der erhöhten Phosphorylierung von Akt, wie Belkhiri und Kollegen ihn bereits beschrieben hatten, weiter zu analysieren, wurde schließlich die Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 überprüft (Belkhiri et al., 2008). Bcl-2 wird nur in den Zellen exprimiert, bei denen auch DARPP-32 nachweisbar war (Abb. 21B). Die Bcl-2 Expression verändert sich jedoch nicht in Abhängigkeit der DARPP-32 bzw. t-DARPP Expressionsstärke (Abb. 21B). Inwieweit Bcl-2 an der Ausbildung der Trastuzumab Resistenz beteiligt ist, bleibt jedoch unklar.

3.2.2.6 Die Zunahme der HER2/HER3-Heterodimere in Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR führt zur Rekrutierung von PI3K

Die Komplexität des HER2-Signalnetzwerkes spiegelt sich in der Tatsache wider, dass prinzipiell alle HER-Familienmitglieder untereinander aktive Rezeptorkomplexe ausbilden können (Yarden und Sliwkowski, 2001). Diese Flexibilität und die Möglichkeit Dimere mit anderen Rezeptortyrosinkinasen, wie c-Met oder IGF-1R, zu bilden wird mehrfach als potentieller Mechanismus für die Entstehung von Resistenzen diskutiert (Engelman et al., 2007; Nahta et al., 2005).

Es stellte sich deshalb die Frage, ob sich in den Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR die Dimerisierungspartner von HER2 unterscheiden. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde HER2 mittels anti-ErbB2 Affibody Molecule[®] jeweils aus normierten Zelllysaten der 3D-Kulturen von SKBR-3, SKBR-3 HR und SKBR-3 HR- präzipitiert und im Western-Blot analysiert. Die Zellen wurden jeweils mit und ohne Trastuzumab für 48 h inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei den resistenten Zellen SKBR-3 HR mehr HER3 kopräzipitiert werden konnte (Abb. 22A). EGFR hingegen wurde nur in der Linie SKBR-3 HR- kopräzipitiert (Abb. 22A). Die regulatorische Untereinheit von PI3K p85 ist bei SKBR-3 HR und SKBR-3 HR- stärker mit HER2 assoziiert (Abb. 22A). Die Tatsache, dass bei SKBR-3 HR mehr HER3 und p85 mit HER2 kopräzipitieren könnte eine Erklärung für die erhöhte Akt Phosphorylierung liefern, wie sie in Abbildung 21B nachweisbar war. Die Behandlung mit Trastuzumab hatte keinen Effekt auf die Assoziation von HER3, EGFR und p85 mit HER2 (Abb. 22A).

Außerdem konnte bei SKBR-3 HR eine signifikant höhere Menge des Adapterproteins Shc mit HER2 kopräzipitiert werden (Abb. 22A). Trastuzumab führte zu einer Verringerung der Shc Kopräzipitation (Abb. 22A). Die Abnahme von Shc nach der Behandlung mit dem therapeutischen Antikörper weist darauf hin, dass der MAPK-Signalweg in SKBR-3 HR von Trastuzumab weiterhin inhibiert werden kann.

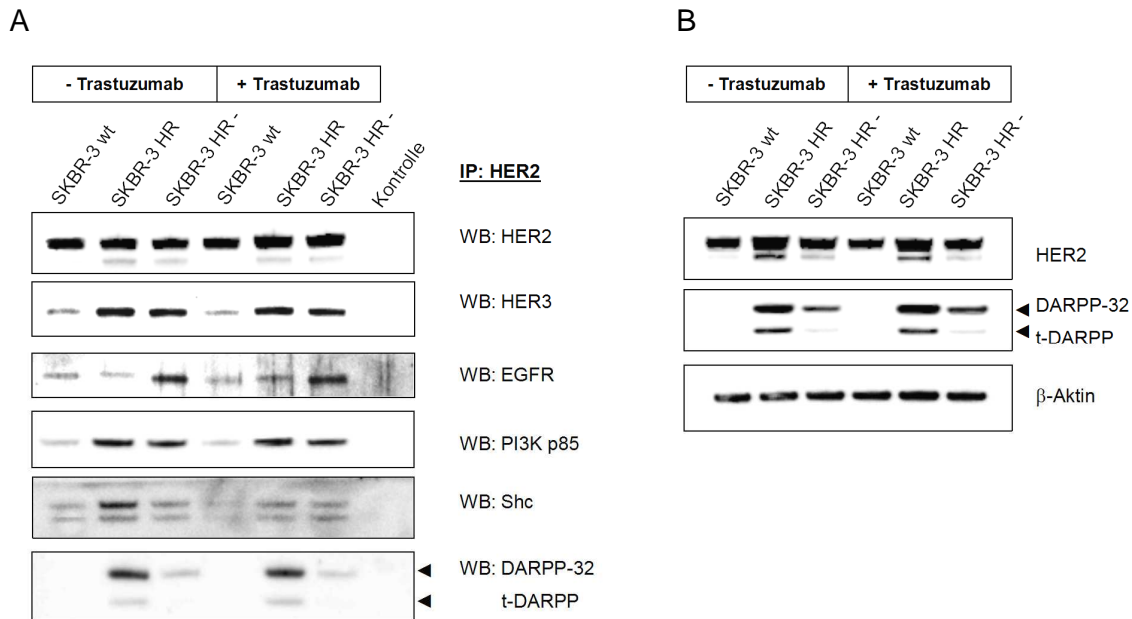


Abb. 22: In der Trastuzumab resistenten Linie SKBR-3 HR liegen vermehrt HER2/HER3-Heterodimere in 3D-Kultur vor. SKBR-3 wt, SKBR-3 HR und SKBR-3 HR- wurden auf poly-HEMA beschichtete 6-Napfplatten ausgesät. Vor Aussaat der SKBR-3 HR in 3D-Kultur wurden die Zellen passagiert und 48 h ohne Zusatz von Trastuzumab in 2D vorinkubiert. Nach 48 h Inkubation der Zellen ohne oder in Gegenwart von 10 µg/ml Trastuzumab wurden die Spheroide lysiert. **A** Western-Blot Analyse der HER2-Präzipitate aus SKBR-3 wt, SKBR-3 HR und SKBR-3 HR- Zelllysaten. HER2 wurde aus je 120 µg Gesamtzelllysate mittels 35 µl anti-ErbB2 Affibody Molecule® über Nacht präzipitiert. Als Kontrolle (K) wurden 35 µl anti-ErbB2 Affibody Molecule® in Lysepuffer inkubiert. Die Auftrennung der Proteinpräzipitate erfolgte mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel. **B** Western-Blot Analyse des Gesamtproteingehalt der normierten Zelllysate vor der HER2-Präzipitation. Hierzu wurden 25 µg Gesamtprotein pro Spur auf ein 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Interessant war, dass DARPP-32 und geringe Mengen an t-DARPP als Kopräzipitate von HER2 nachweisbar waren (Abb. 22A). Die Behandlung mit Trastuzumab hatte keine Auswirkung auf die Assoziation der DARPP Proteine mit HER2 (Abb. 22A). Die Menge an kopräzipitiertem DARPP-32 bzw. t-DARPP nimmt in den Zellen, die erneut auf Trastuzumab ansprechen (SKBR-3 HR-), signifikant ab (Abb. 22A).

Abbildung 22B repräsentiert die Gesamtzelllysate vor der Präzipitation mit anti-ErbB2 Affibody Molecule®.

Zusammengefasst kann man sagen, dass in den Trastuzumab resistenten Zellen bevorzugt HER2/HER3-Heterodimere gebildet werden was in einer verstärkten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs resultiert. Es ist nach wie vor unklar, wie DARPP-32 und t-DARPP mit HER2 verknüpft sind, da bisher keine direkte Bindung an den Rezeptor HER2 publiziert wurde.

3.2.3 Untersuchung der DARPP-32 Proteinexpression in humanen Tumorproben

3.2.3.1 DARPP-32 wird in humanen, HER2-positiven Tumoren exprimiert

Die Expression von DARPP-32 und t-DARPP in humanen Tumoren wurde bereits mehrfach beschrieben (Wang et al., 2005; Kauraniemi und Kallioniemi, 2006). Der Nachweis erfolgte dabei anhand von IHC-Studien verschiedener maligner Gewebetypen sowie mittels mRNA- und Proteinexpressionsprofilen (Beckler et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde DARPP-32 bisher in einer HER2-überexprimierenden Zelllinie untersucht. Im Folgenden sollte nun analysiert werden, ob die DARPP-32 Expression in humanen Tumorproben in Zusammenhang mit dem HER2-Expressionsniveau steht.

Um dies zu klären, wurde die DARPP-32 und t-DARPP Expression in HER2-positiven und -negativen humanen Tumorproben untersucht, die kommerziell erhältlich waren. Über die genomische Amplifikation von *DARPP-32* in der jeweiligen Tumorprobe waren keine Angaben verfügbar. Der Grad der HER2-Expression wurde mit Hilfe des HercepTest™ (Dako) durchgeführt, einem semiquantitativen immunzytochemischen Nachweis für die Bestimmung der Überexpression des HER2-Proteins in Mammakarzinom-Geweben, die für die histologische Bewertung routinemäßig verarbeitet werden. Die Einstufung der HER2-Expression erfolgt dann nach negativ (Intensität der Farbreaktion: 0 und 1+), schwach positiv (Intensität der Farbreaktion: 2+) und stark positiv (Intensität der Farbreaktion: 3+).

Tab.3: HER2-Expressionsstatus von Brustkarzinomproben, klassifiziert mittels HercepTest™. Die Überexpression des HER2-Proteins im Mammakarzinom wird anhand einer immunzytochemischen Analyse von Gewebeschnitten bestimmt. Die Intensität der Farbreaktion 0 und 1+ wird allgemein als negativ eingestuft.

Tumorprobe	HER2-Status
16	0
17	1+
18	0
19	1+
20	1+
21	0
22	0

Die hier verwendeten Brusttumorproben 1-12 (Abb. 23A) haben laut HercepTest™ eine HER2-Expression von 3+ und die Proben 16-22 (Abb. 23B) eine Expression von 0 bis 1+

(Tab. 3) (Information des Lieferanten). Die Ovarialkarzinomproben 13-15 (Abb. 23B) wurden nicht klassifiziert.

In Zusammenarbeit mit der Pathologieabteilung von Roche wurden Kryoschnitte angefertigt und mit Hämalaun/Eosin-Lösung gefärbt, um das neoplastische Gewebe zu typisieren und um es eindeutig vom partiell vorhandenen Normalgewebe zu unterscheiden. Anschließend wurden aus den neoplastischen Bereichen der Tumorprobe ca. 40-80 mg Gewebe entnommen, das dann lysiert und für die Analyse im Western-Blot aufbereitet wurde. Zum Vergleich wurde das Lysat der Trastuzumab resistenten Linie SKBR-3 HR mit aufgetragen (HR, Abb. 23A u. B jeweils letzte Spur).

In den Tumorproben 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11 und 12 in Abbildung 23A und bei Probe 15 in Abbildung 23B konnte die Expression von DARPP-32 in unterschiedlichen Intensitäten nachgewiesen werden. Bis auf Probe 10 exprimieren auch alle Proben deutlich die verkürzte Form t-DARPP (Abb. 23A). In Probe 2 konnte nur eine schwache t-DARPP Expression nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte DARPP-32 oder t-DARPP in 9 von 22 (41%) humanen Tumorproben nachgewiesen werden. Unklar ist weshalb in den Proben 7, 8 und 10 im Western-Blot kein oder nur ein schwaches HER2-Signal zu detektieren war, da alle Proben 1-12 zuvor als HER2 3+ eingestuft wurden.

Tendenziell kann man erkennen, dass DARPP-32 und t-DARPP meist nur in Tumorproben nachweisbar waren, die auch HER2 exprimierten.

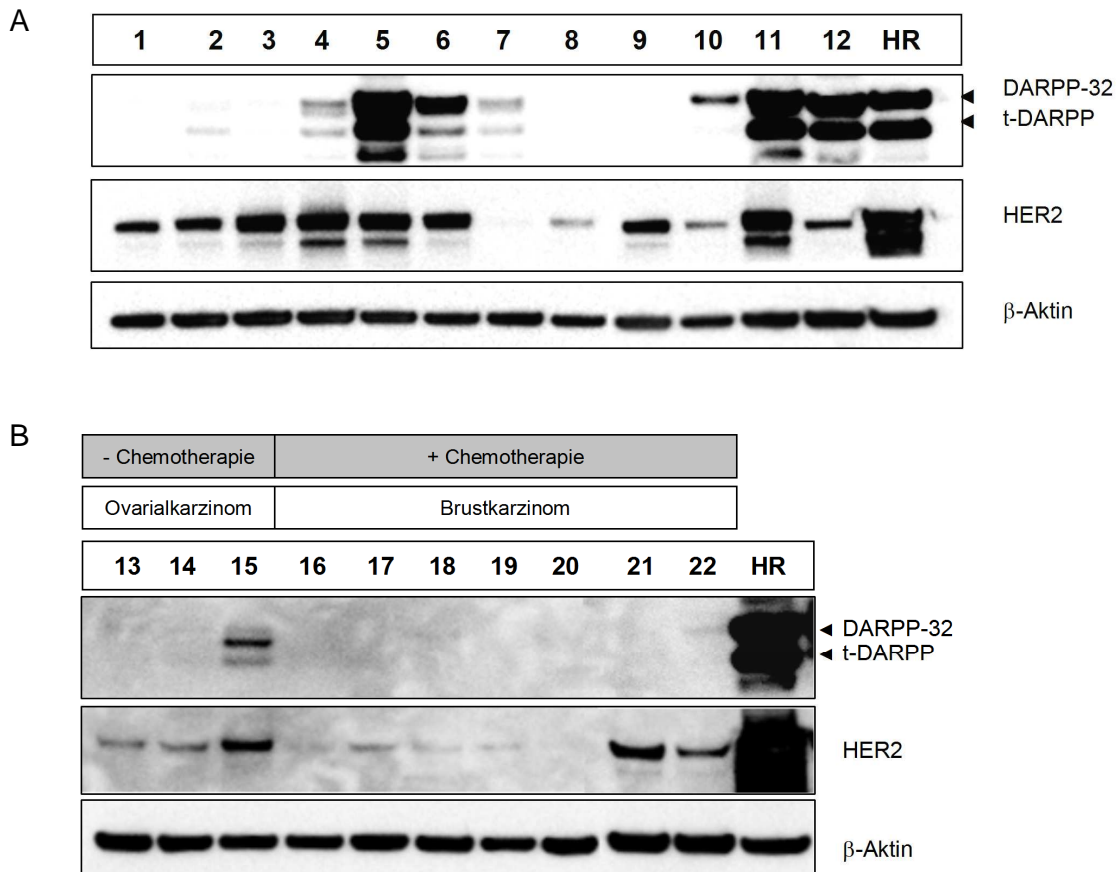


Abb. 23: Western-Blot Analyse der DARPP-32 und t-DARPP Expression in humanen Tumorproben. Gefrorenen humane Tumorproben wurden lysiert und die Proteine mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Als Vergleich diente das Zelllysate der Trastuzumab resistenten SKBR-HR (HR, jeweils letzte Spur). Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Pro Spur wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen. **A** Analysiert wurden humane Brustkarzinomproben, die mittels HercepTest™ als HER2 3+ eingestuft wurden. **B** Analysiert wurden humane Ovarial- (13-15) und Brustkarzinomproben (16-22). Der HER2-Status wurde ausschließlich für die Brustkarzinomproben mittels HercepTest™ bestimmt (Tab. 3). Die Ovarialkarzinomproben stammen von Patientinnen, die keine Chemotherapie erhalten hatten und die Brustkarzinomproben von Patientinnen, die eine Chemotherapie erhalten hatten.

3.2.3.2 Nachweis von DARPP-32 in mit Chemotherapeutika behandelten humanen

Tumorproben

DARPP-32 und t-DARPP werden in der Literatur als antiapoptotisch wirkende Proteine diskutiert (Belkhiri et al., 2005). In diesem Zusammenhang kam die Frage auf, ob DARPP-32 und t-DARPP als Folge einer Chemotherapie hochreguliert werden, um dem Tumor so einen gewissen Überlebensvorteil zu verschaffen.

Um erste Hinweise auf diese Fragestellung zu bekommen, wurden zehn Tumorproben von Patientinnen untersucht, die mit oder ohne Chemotherapeutika behandelt wurden. Drei Patientinnen hatten keine Chemotherapie erhalten und sieben wurden zuvor behandelt (Abb.

23B). Zum Vergleich des DARPP Expressionsniveaus wird die Trastuzumab resistente Linie SKBR-3 HR verwendet.

Die Western-Blot Analyse hat gezeigt, dass in keiner der sieben, mit Chemotherapeutika behandelten, Tumorproben DARPP-Protein nachweisbar war (Abb. 23B). Die Probe einer Patientin, die sich keiner Chemotherapie unterzogen hatte, war positiv für DARPP-32 und t-DARPP (Nr. 15, Abb. 23B).

Diese Daten liefern nur einen vagen Hinweis dafür, dass eine Chemotherapie nicht gleichzeitig zu einer verstärkten Expression von DARPP-32 führt. Um eine generelle Aussage zu treffen, müssten mehr Tumore untersucht werden und außerdem der Status der DARPP-32 Genamplifikation überprüft werden.

3.2.4 Die Überexpression von DARPP-32 und t-DARPP in SKBR-3 beeinflussen nicht die Inhibition der Zellproliferation durch Trastuzumab

Um die Beteiligung von DARPP-32 und t-DARPP an der Ausbildung einer Resistenz gegen Trastuzumab ausführlicher zu prüfen, wurden jeweils DARPP-32, t-DARPP und die Doppelmutante DARPP-32-T34A-T75A, sowie ein Kontrollvektorkonstrukt stabil in SKBR-3 transfiziert. Bei der Doppelmutante sind die beiden wichtigsten Phosphorylierungsstellen Thr 34 und Thr 75 mutiert. Belkhiri und Kollegen konnten zeigen, dass Zellen, die diese Doppelmutante überexprimierten, nicht mehr resistent gegen Camptothecin waren und Apoptose induziert werden konnte (Belkhiri et al., 2005). Die beiden Phosphorylierungsstellen könnten demnach eine kritische Rolle bei der Entstehung der Resistenz gegen Trastuzumab spielen und wurden deshalb mit untersucht.

Zunächst wurde das Zellwachstum der verschiedenen polyklonalen Zelllinien in 3D-Kultur überprüft. Der Vergleich der jeweiligen Wachstumskurven zeigte kein unterschiedliches Proliferationsverhalten (Abb. 24A). Erwähnenswert ist, dass die initiale relative Lichteinheit bei SKBR-3 Wilttyp trotz gleicher Zellzahl deutlich höher war (Abb. 24A).

Im Western-Blot wurde die stabile Expression von DARPP-32, t-DARPP und die der Doppelmutante DARPP-32-T34A-T75A nachgewiesen (Abb. 24B). Um die Expressionsstärken zu vergleichen wurde das Lysat der resistenten Linie SKBR-3 HR mit aufgetragen. Die Expression der rekombinanten DARPP Proteine war in allen stabilen Linien schwächer als in SKBR-3 HR (Abb. 24B). Zudem führt die Überexpression des Vollängen DARPP-32 nicht automatisch zur Expression des t-DARPP (Abb. 24B).

Die Menge an HER2-Protein wird durch die Überexpression von DARPP nicht beeinflusst (Abb. 24B). Im Gegensatz dazu induziert die Überexpression von DARPP-32 und t-DARPP

in SKBR-3 eine verstärkte Phosphorylierung der Akt Kinase (Abb. 24B). Das Phosphosignal ist jedoch schwächer als das bei SKBR-3 HR, was sehr wahrscheinlich auf die niedrigere DARPP-Expression zurückzuführen ist. Die Zelllinie, welche die Doppelmutante überexprimiert, zeigt im Vergleich zu der DARPP-32 und t-DARPP überexprimierenden Linie ein schwächeres Phosphorylierungssignal von Akt (Abb. 24B). Die Aktivierung von Akt deutet darauf hin, dass die rekombinanten Proteine in den Zellen funktionell sind.

Die Induktion des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 konnte durch die Überexpression von DARPP jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 24B). Zuvor hatte Belkhiri und Kollegen beschrieben, dass die Überexpression von t-DARPP in der Magenkarzinomlinie AGS zur Expression von Bcl-2 führt und die Zellen dadurch eine erhöhte Apoptoseresistenz aufwiesen (Belkhiri et al., 2008).

Schließlich wurde überprüft, ob die Überexpression der DARPP-Proteine ausreicht, um eine Resistenz gegen die Behandlung mit Trastuzumab zu induzieren. Die rekombinanten Linien wurden dafür in 3D-Kultur mit 10 µg/ml Trastuzumab inkubiert und die Proliferation der Zellen nach 7 Tagen überprüft.

Wie in Abbildung 25 ersichtlich ist, kann die Zellproliferation der Linien, die DARPP-32 und t-DARPP überexprimieren, immer noch mit Trastuzumab inhibiert werden. Die Anzahl der lebenden Zellen nach 7 Tagen Inkubation ist vergleichbar mit der bei SKBR-3 Wildtyp und der Kontrolllinie (Tab. 4).

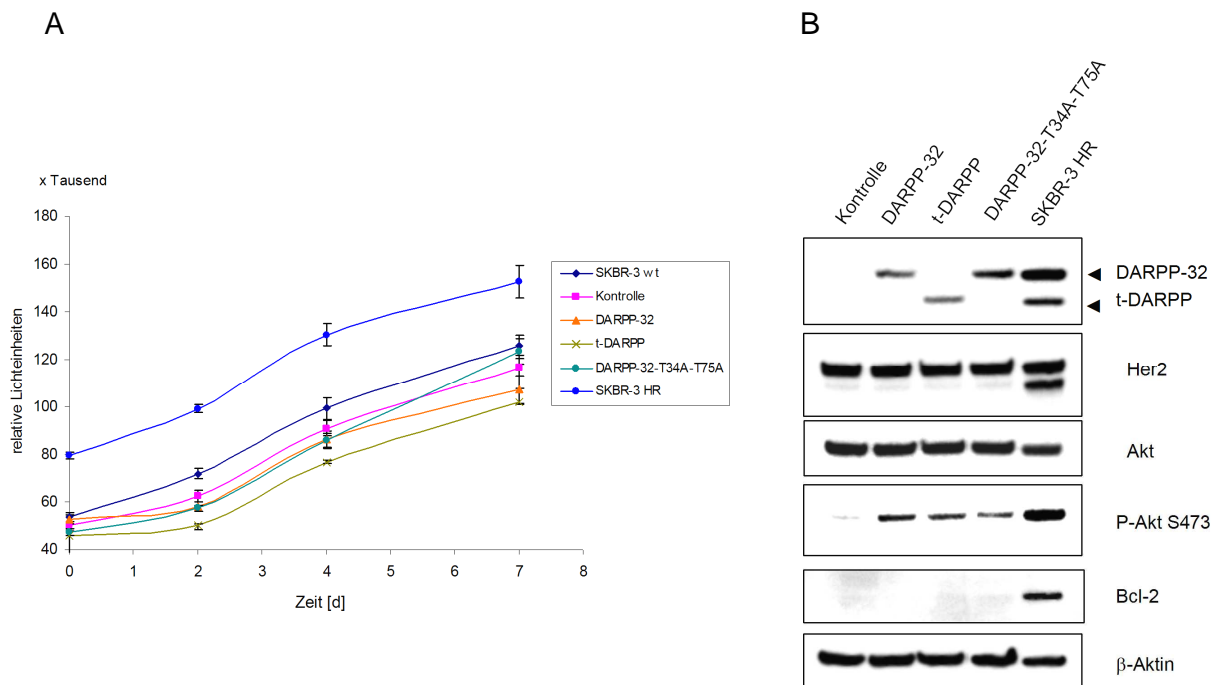


Abb. 24: Die stabile Transfektion von DARPP-32 in SKBR-3 induziert die Phosphorylierung von Akt in 3D-Kultur. SKBR-3 wurden stabil, unter Selektion mit 0,7 mg/ml G418, mit *pcDNA3-DARPP-32*, *pcDNA3-t-DARPP*, *pcDNA3-DARPP-32-T34A-T75A* transfiziert. Als Kontrolle wurde ein Levektorkonstrukt *pcDNA3* transfiziert. **A** Dargestellt sind die Wachstumskurven der verschiedenen rekombinanten Zelllinien, der Ausgangszelllinie SKBR-3 wt und der Trastuzumab resistenten Linie SKBR-3 HR. Die Proliferation wurde mittels CellTiter Glo® bestimmt. Jeder Zeitpunkt repräsentiert den Mittelwert der relativen Lichteinheiten aus fünf Replikaten und die Standardabweichung. **B** Western-Blot Analyse der stabil transfizierten DARPP-Linien und SKBR-3 HR nach 48 h Kultivierung in 3D. SKBR-3 HR wurden in Gegenwart von 10 μ g/ml Trastuzumab inkubiert. Die Proteine wurden mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und als Ladekontrolle diente β -Aktin. Pro Spur wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

Dieses Experiment hat gezeigt, dass allein die Überexpression von DARPP-32 oder t-DARPP in SKBR-3 nicht ausreicht um eine Resistenz gegen Trastuzumab zu induzieren. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Menge an überexprimiertem Protein vergleichbar gering war.

Die Koexpression beider DARPP-Proteine wurde in einem gesonderten Experiment überprüft, jedoch dominierte in dieser rekombinanten Zelllinie die t-DARPP Expression, weshalb diese Zelllinie nicht für weitere Analysen verwendet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

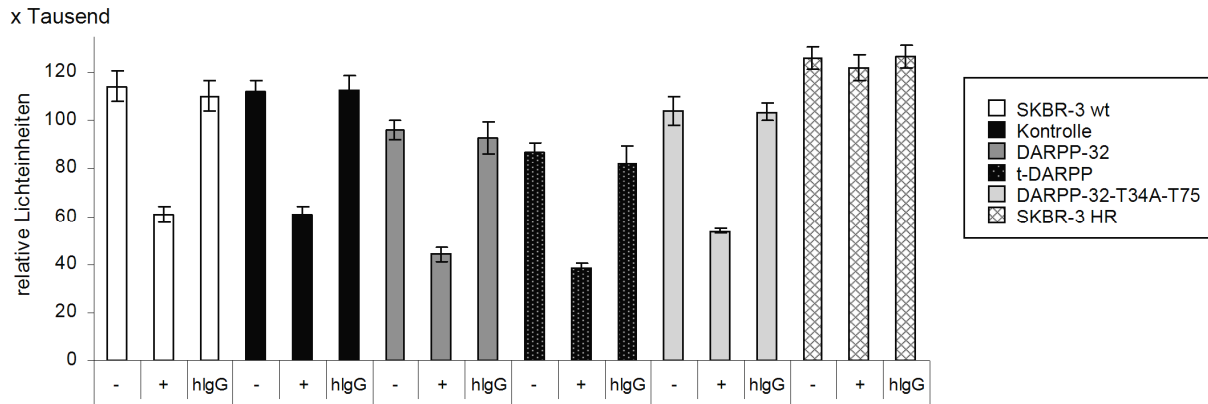


Abb. 25: Trastuzumab inhibiert die Zellproliferation der stabil transfizierten DARPP-Linien. Überprüft wurde der inhibitorische Effekt von Trastuzumab. Die mit den Konstrukten *pcDNA3-DARPP-32*, *pcDNA3-t-DARPP*, *pcDNA3-DARPP-32-T34A-T75A* und *pcDNA3* (Kontrolle) stabil transfizierten SKBR-3, sowie die Wildtyplinie SKBR-3 und die Trastuzumab resistente SKBR-3 HR wurden in poly-HEMA beschichtete 96-Napfplatten ausgesät. Die Zellen wurden ohne (-) und mit (+) von 10 µg/ml Trastuzumab, sowie mit 10 µg/ml humanem IgG (hIgG) für 7 Tage inkubiert. Die Zellproliferation wurde anschließend mittels CellTiter Glo® bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Lichteinheiten aus fünf Replikaten und die Standardabweichung.

Tab. 4: Übersicht über die Inhibition der Zellproliferation durch Trastuzumab in %. Die Zellproliferation wurde mit dem CellTiter Glo® Reagenz bestimmt. Die Inhibition der Proliferation durch Trastuzumab wurde unter Einbezug der humanen Isotypkontrolle (hIgG) (entspricht 100%) berechnet.

	% Zellen nach Trastuzumab Behandlung (normiert auf hlgG-Kontrolle)
SKBR-3 wt	55
Kontrolle	54
DARPP-32	48
t-DARPP	47
DARPP-32-T34A-T75A	52
SKBR-3 HR	96

3.2.5 Der duale Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib inhibiert die Proliferation der Trastuzumab resistenten SKBR-3 HR

Eine alternative Strategie für die Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen basiert auf der Verwendung von synthetischen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs), sogenannten „small molecules“. Die TKIs konkurrieren mit Adenosintriphosphat (ATP) um die Bindung in der ATP-Tasche der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase. Die katalytische Aktivität des Rezeptors wird dadurch gehemmt und es kommt zu einer Inhibition der nachgeschalteten intrazellulären Signalwege.

Ein besonderer Tyrosinkinaseinhibitor stellt Lapatinib dar, da er spezifisch EGFR und HER2 inhibieren kann. Des Weiteren weisen Studien darauf hin, dass Lapatinib Apoptose in Trastuzumab refraktären Zelllinien und Brusttumoren induzieren kann (Johnston und Leary, 2006; Nahta et al., 2007).

Um zu prüfen, ob Lapatinib die Zellproliferation der Trastuzumab resistenten Linie SKBR-3 HR inhibiert, wurden die Zellen in Gegenwart von Lapatinib für 3 Tage in 3D-Kultur inkubiert. Die Zahl der lebenden Zellen wurde anschließend mit dem CellTiter Glo® Reagenz bestimmt.

Abbildung 22A zeigt, dass der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib konzentrationsabhängig das Wachstum der refraktären Zellen SKBR-3 HR hemmt.

Der Effekt von Lapatinib auf die HER2-Phosphorylierung und die nachgeschalteten Signalwege wurde im Western-Blot überprüft. Hierfür wurden die Zellen in Gegenwart von 1 μ M Lapatinib für 24 h in 3D kultiviert.

Bereits nach 24 h Inkubation mit Lapatinib war die Phosphorylierung von HER2 und HER3 fast vollständig inhibiert und ebenso die Phosphorylierung von Akt und MAPK (Abb. 26B). Die Expression von DARPP-32 wird durch Lapatinib nicht beeinflusst (Abb. 26B).

Dieses Experiment zeigt, dass die Überexpression von DARPP keinen Einfluss auf die Inhibition der Zellproliferation mit Lapatinib hat.

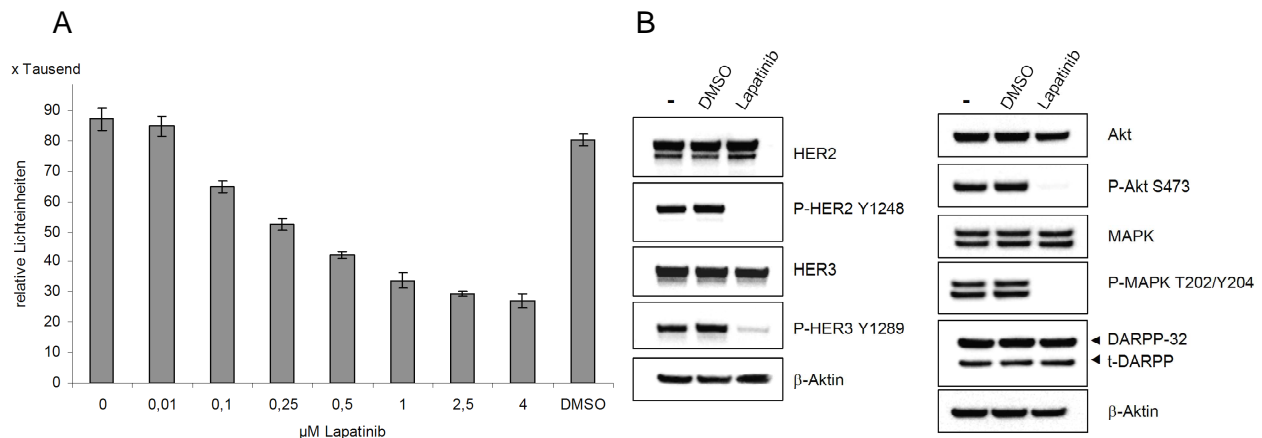


Abb. 26 Inhibition der Zellproliferation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib. **A** Dargestellt ist das Zellwachstum von SKBR-3 HR in 3D-Kultur in Abhängigkeit von der Lapatinib Konzentration. Die Zellen wurden jeweils ohne und mit Lapatinib für 72 h inkubiert. Die Messung der Zellproliferation erfolgte mittels CellTiter Glo®. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der relativen Lichteinheiten aus fünf Replikaten und die Standardabweichung. **B** Western-Blot Analyse der Zelllinie SKBR-3 HR nach Inkubation der Zellen ohne und in Gegenwart von 1 μ M Lapatinib für 24 h in 3D-Kultur. Als Kontrolle wurden die Zellen in 0,1% DMSO inkubiert. Die Proteine wurden mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Pro Spur wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

4 Diskussion

4.1 dreidimensionale Zellkultur als verbessertes *in vitro* Tumormodell

Ein Großteil der publizierten Ergebnisse in der Tumorbilogie ist auf die Verwendung von herkömmlichen zweidimensionalen Zellkultursystemen zurückzuführen. Diese *in vitro* Experimente spiegeln jedoch kaum die physiologischen Bedingungen eines Tumors *in vivo* wider, da die Tumorzellen nicht im Zellverband sondern individuell analysiert werden. Dreidimensionale Tumormodelle erlauben die Charakterisierung von Tumorzellen als Zellverband, in dem die Zellen untereinander kommunizieren und Stoffaustausch betreiben können.

Das in dieser Arbeit verwendete 3D-Zellkultursystem beruht auf der Eigenschaft von Tumorzellen substratunabhängig zu wachsen. Obwohl nicht die gesamte Komplexität eines Tumors mit diesem 3D-System abgebildet werden kann, so eignet es sich dennoch zur Simulation von kleinen, proliferierenden, avaskularen Tumorarealen und Mikrometastasen. Je nach Zelllinie können Tumorzellen auf poly-HEMA beschichteten Zellkulturplatten spontan zu Sphroiden aggregieren. Die Morphologie der Spheroide kann entweder sehr kompakte Zellaggregate ohne definierte Einzelzellstruktur aufweisen oder Zellaggregate mit erkennbarer Einzelzellstruktur (Abb. 7B und 8C).

Im Vergleich zu in Agarose oder Matrigel eingebetteten Sphroiden erlaubt diese Methode eine schnelle und unkomplizierte Analyse der Zellen auf zellbiologischer und biochemischer Ebene, da die Zellaggregate im Medium frei schwimmen und nicht durch aufwendige Extraktionsprozesse aus einer Matrix isoliert werden müssen (Lee et al., 2007).

Ein weiterer Vorteil dieser schnellen und einfachen Methode der Sphroidgenerierung auf poly-HEMA beschichteten Platten ist, dass sie den Einfluss von mechanischem Stress auf die Zellen ausschließt, anders als bei Rotationsschüttlern oder nach dem Zentrifugieren der Zellen in poly-HEMA beschichteten Platten (Sutherland et al., 1979; Ivascu und Kubbies, 2006).

Schwer definierbare Faktoren wie mechanischer Stress, unzureichend definierte und variierende Komponenten im Matrigel® und Agenzien zur Sphroidextraktion könnten einen Einfluss auf die Signalwege in den Tumorzellen ausüben. Mit der hier verwendeten Methode können diese Faktoren jedoch ausgeschlossen werden.

Ein maßgeblicher Unterschied beim Vergleich der 2D- und 3D-Kultur ergab sich bei der Behandlung von SKBR-3 und SKOV-3 mit Trastuzumab. Die Proliferation der Zellen konnte bei beiden Linien in Anwesenheit von Trastuzumab im 3D-System deutlich stärker inhibiert

werden als in der 2D-Kultur (Abb. 7A). In Bezug auf den inhibitorischen Effekt von Trastuzumab auf HER2-überexprimierende Zelllinien in 2D-Kultur finden sich in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse. Der Effekt bei SKBR-3 variiert zwischen 20% und 50%, was hauptsächlich auf die unterschiedlichen Ausgangsbedingungen zurückzuführen ist (Hudziak et al., 1989; Lu et al., 2001; Cuello et al., 2001). Eigene Daten zeigen, dass die Inhibition der Proliferation stark von der Zellzahl abhängt (Daten nicht gezeigt). Da eine zu geringe Zellzahl in den Experimenten überlappende Effekte aus Proliferationsinhibition und Stressinduktion vermuten lässt, wurde in dieser Arbeit für die 2D- und 3D-Kultur bewusst eine Zellzahl gewählt, die eine Stressinduktion vermeiden sollte. Hervorzuheben ist auch, dass die Zellen in allen Experimenten kontinuierlich in 10% fötalem Kälberserum (FKS) und ohne zusätzliche HER-Liganden kultiviert wurden.

Die Daten aus dieser Arbeit weisen darauf hin, dass das beschriebene 3D-Modell einige *in vivo* Aspekte des HER2-Signalmusters besser reflektiert und deshalb als Basis für die weitere Aufklärung des Wirkmechanismus von Trastuzumab dienen kann. Außerdem ermöglicht dieses 3D-Modell eine Hochdurchsatzanalyse von Sphroiden auf 384-Napfplatten.

4.2 Die Aktivierung von HER2-Homodimeren wird in 3D-Kultur begünstigt

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inkubation von HER2 überexprimierenden Tumorzellen in 3D-Kultur eine signifikante Phosphorylierung von HER2 am Tyrosinrest Y1248 induziert (Abb. 8A und B). Diese Phosphorylierungsstelle ist eine der beiden wichtigsten Autophosphorylierungsstellen von HER2 und verknüpft den aktivierten Rezeptor mit dem Ras-Raf-MAPK-Signalweg, der die Proliferation der Zellen reguliert (Kwon et al., 1997; Dankort et al., 2001). Interessanterweise konnte bei allen 3D-Kultur Experimenten eine Herunterregulierung der Akt-Phosphorylierung an S473 beobachtet werden (Abb. 8A und B) und im Fall der Zelllinien SKBR-3 und SKOV-3 eine Aktivierung des MEK-MAPK-Signalwegs. Die Ergebnisse aus den Kopräzipitationsexperimenten mit HER2 könnten eine mögliche Erklärung für die verringerte Phosphorylierung von Akt liefern. In 3D-Kultur waren HER2/HER3-Heterodimerkomplexe kaum nachweisbar, was unter anderem mit einer geringeren Assoziation der p85 Untereinheit von PI3K korrelierte (Abb. 10A). Der PI3K/Akt Signalweg wird vorwiegend über HER2/HER3-Heterodimere aktiviert. HER3 enthält im C-terminalen Bereich sechs Kopien des Sequenzmotifs Tyr-X-X-Met, an welche die p85 Untereinheit von PI3K binden (Soltoff et al., 1994; Kim et al. 1994). Den Rezeptoren EGFR und HER2 fehlt dieses Sequenzmotiv (Soltoff et al., 1994). Aus diesem Zusammenhang erschließt sich, dass die Herunterregulierung von Phospho-Akt in 3D-Kultur das Ergebnis einer Umorganisation der HER2-Dimere in 3D-Kultur ist. Die verstärkte

Assoziation der Adapterproteine Shc und Grb2 mit HER2 im 3D-Ansatz stützt die Hypothese, dass bei SKBR-3 in 3D-Kultur bevorzugt HER2-Homodimere gebildet werden (Abb. 10A). Dass Zellen, die HER2 überexprimieren, eine ausgeprägte und bevorzugte Aktivierung des MAPK-Signalwegs aufweisen, konnte bereits gezeigt werden (Ben-Levy et al., 1994; Karunagaran et al., 1996). Die Rekrutierung der Adapterproteine Grb2 und Shc, beides Aktivatoren des MAPK-Signalwegs, an den phosphorylierten Rezeptor HER2 führt zu einer gesteigerten Zellproliferation und gewährleistet das Überleben der Tumorzellen (Dankort et al., 2001; Timms et al., 2002; Slamon et al., 1989).

Welche Rolle die Kopräzipitation von EGFR mit HER2 in 3D-Kultur spielt ist noch unklar. Untersuchungen mit dem therapeutischen Antikörper Cetuximab (Erbix[®]), der die Aktivierung von EGFR inhibiert, haben gezeigt, dass die Proliferation von SKBR-3 in 3D-Kultur nicht inhibiert wird (Daten nicht gezeigt). Die Kopräzipitation von EGFR nimmt genau nach 24h ab, einem Zeitraum, der den Vorgang der Zellaussaat und die Spheroidformation beinhaltet. Eine Zunahme der EGFR-Liganden Expression konnte basierend auf den Ergebnissen des Genexpressionsprofils (Daten nicht gezeigt) ausgeschlossen werden, so dass EGFR im Rahmen des 3D-Modells keine tragende Rolle zu spielen scheint und nur transient mit HER2 assoziiert ist.

Dass sich die HER2-Dimerisierungspartner in 3D-Kultur unterscheiden kann auch aus den Ergebnissen des linearen Sucroседichtegradienten abgeleitet werden. Die Verschiebung des Anteils an HER3 in der 3D-Kultur in Richtung der löslichen Fraktionen zeigt, dass in den Fraktionen 6-8 weniger HER3-Rezeptoren für eine potentielle Dimerisierung mit HER2 zur Verfügung stehen (Abb. 16). Die Anwesenheit von Caveolin-1 in der 2D-Kultur führt zu einer verstärkten Assoziation der HER-Rezeptoren mit detergenzunlöslichen Membrandomänen, die größtenteils in der Zelldebris nachweisbar sind (Abb. 16). Couet und Kollegen zeigten, dass Caveolin-1 mit den Rezeptoren HER2 und EGFR aus Zelllysaten der Zelllinie A431 kofraktioniert werden kann (Couet et al., 1997). Für EGFR konnten sie darüber hinaus eine direkte Interaktion mit Caveolin-1 nachweisen. Daraus könnte man folgern, dass Caveolin in 2D-Kultur die HER-Rezeptoren auf der Zelloberfläche bündelt und sie so mehr oder weniger in einem unflexiblen Dimerisierungszustand hält, der die Aktivierung von HER2 limitiert.

In den HER2-positiven Zelllinien BT474, KPL-4 und Calu-3 konnte eine stärkere Phosphorylierung von MAPK nicht nachgewiesen werden (Abb. 8B) was jedoch nicht ausschließt, dass ein anderer Vertreter der MAPK-Familie als Zielmolekül in der HER2-Signalkaskade dient.

Nach Behandlung mit Trastuzumab konnte bei SKBR-3 und SKOV-3 im 3D-Experiment eine Abnahme der HER2-, MEK1/2- und MAPK-Phosphorylierung nachgewiesen werden, was mit einer verringerten Zellproliferation korrelierte (Abb. 7B, 8A). Es gibt viele Diskussionen über den Effekt von Trastuzumab auf molekularer Ebene, was sich in den unterschiedlichen Ergebnissen in der Literatur widerspiegelt. Beispielsweise konnten Longva und Kollegen erst durch die Zugabe des Liganden EGF eine deutliche HER2-Phosphorylierung bei SKBR-3 nachweisen, die jedoch nach Behandlung mit Trastuzumab nicht inhibiert werden konnte (Longva et al., 2005). In Bezug auf die nachgeschalteten Signalkaskaden berichten sie nur von einer Abnahme des Akt-Phosphosignals. Cuello und Kollegen beschreiben, dass die Gesamtproteinexpression von HER2 nach Inkubation mit Trastuzumab herunterreguliert wurde und die Phosphorylierung von Akt abnimmt, nicht jedoch die von MAPK (Cuello et al., 2001). Es gibt Hinweise, dass Trastuzumab in HER2-überexprimierenden Brusttumorzellen parallel zum Akt-Weg auch den MAPK-Signalweg inhibieren kann (Yakes et al., 2002; Dubska et al., 2005). Ein eindeutiger Wirkmechanismus von Trastuzumab konnte bisher jedoch noch nicht identifiziert werden.

Mit Hilfe des 3D-Modells wurde verdeutlicht, dass Trastuzumab den MAPK-Signalweg inhibiert, da die Inkubation mit dem Antikörper in 3D-Kultur die Dissoziation der Adapterproteine Shc und Grb2 von HER2 zur Folge hatte (Abb. 10A) und schließlich die Abnahme des Phosphosignals bei MAPK (Abb. 8A). Diese *in vitro* Ergebnisse beschreiben den klinischen Nutzen von Trastuzumab viel besser, da das Therapeutikum nur bei einer Subpopulation von HER2-überexprimierenden Brustkrebspatientinnen wirkt (Slamon et al., 1989) und bekannt ist, dass Trastuzumab nur HER2-Homodimere inhibieren kann (Nahta und Esteva, 2007). Die Behandlung mit Trastuzumab konnte bei der Ovarialkarzinomlinie SKOV-3 die Akt-Phosphorylierung in keinem der beiden Kultursysteme beeinflussen, was sich mit Daten aus der Literatur deckt (Longva et al., 2005). Einmal mehr zeigt dies, dass der PI3K/Akt-Weg in Verbindung mit einer Trastuzumabbehandlung bei HER2-überexprimierenden Tumorzellen möglicherweise eine weit weniger tragende Rolle spielt, als aufgrund von Ergebnissen mit einer 2D-Kultur vermutet wird.

4.3 Die Bedeutung von Integrin $\beta 4$ und Rac1/PAK2 in 3D-Kultur

Das hier beschriebene 3D-Modell ermöglicht einen Zell-Zell-Kontakt. Die Vermutung lag deshalb nahe, dass sich möglicherweise auch Unterschiede in der Aktivierung von Proteinen nachweisen lassen, die an der Zelladhäsion beteiligt sind. Da das Adhäsionsmolekül E-cadherin in SKBR-3 aufgrund einer homozygoten Deletion größerer Bereiche des Gens nicht exprimiert ist (Van de Wetering et al., 2001), lag der Fokus auf der Charakterisierung von

Integrin $\beta 4$. Unter anderem auch deshalb, weil es Hinweise gibt, dass Integrin $\beta 4$ eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Metastasierung spielt (Mercurio und Rabinovitz, 2001). Interessanterweise ließ sich nur in der 3D-Kultur von SKBR-3 eine deutliche Phosphorylierung von Integrin $\beta 4$ am Tyrosinrest 1526 nachweisen (Abb. 9). Diese Phosphorylierungsstelle kann das Adapterprotein Shc rekrutieren und nachgeschaltete MAPK-Kaskaden aktivieren (Dans et al., 2001). Guo und Kollegen konnten vor kurzem nachweisen, dass Integrin $\beta 4$ entscheidend für die Tumorzellproliferation in Zusammenhang mit einer HER2-Überexpression ist und dass dieser Effekt nicht nur auf die Bindung von ECM-Liganden an Integrin $\beta 4$ beruht (Guo et al., 2006). Diese Studie hat auch hervorgehoben, dass murine Brusttumore, die Wildtyp Integrin $\beta 4$ überexprimierten eine desintegrierte Gewebearchitektur aufwiesen, vergleichbar mit den auf poly-HEMA induzierten Sphroiden. Dies steht im Gegensatz zu den Studien von Weaver und Kollegen, deren Fokus auf polarisierten 3D-Modellen liegt, die mit Hilfe von Matrigel induziert werden (Weaver et al., 2002). Eine Hypothese wäre, dass Integrin $\beta 4$ die Aktivierung von Rac1/PAK2 vermittelt, einem Signalweg, der in 3D-Kultur den Akt-Weg kompensieren könnte. Die Tatsache, dass im 3D-Modell die inhibitorische Phosphorylierung von Rac1 am Serin 71 fehlt (Abb. 9) korreliert zudem eindeutig mit der inaktivierten Akt-Kinase (Kwon et al., 2000). Als Konsequenz ist PAK2 nur in 3D-Kultur phosphoryliert (Abb. 9).

In der Literatur gibt es Anhaltspunkte wonach die Aktivierung von PAK die Expression bzw. die Aktivität von Mitgliedern der MAPK-Familie, wie p38 MAPK, ERK1 oder JNK, regulieren kann (Lu et al., 1997). Friedland und Kollegen postulieren eine Integrin $\beta 4$ abhängige Aktivierung von Rac1/PAK1 in humanen Brustepithelzellen im 3D-Modell (Friedland et al., 2007). Dieser Signalweg ist für die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B verantwortlich und führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose stimulierenden Agenzien.

Da bekannt ist, dass die Mitglieder der PAK-Familie in verschiedene zelluläre Prozesse wie der Reorganisation des Zytoskeletts, der Zellmotilität und Proliferation involviert sind (Bokoch, 2003), könnte die Aktivierung dieses Signalwegs das Ergebnis einer veränderten Zellmorphologie bzw. -organisation in der 3D-Kultur sein. Diese Restrukturierung ermöglicht neue Signalplattformen, die in einer herkömmlichen 2D-Kultur nicht zur Verfügung stehen.

4.4 Ist eine Reorganisation der Zelloberfläche in 3D-Kultur der Schlüssel für eine Zunahme der HER2-Aktivierung?

Erste Hinweise auf eine veränderte Struktur der Zelloberfläche konnten in dieser Arbeit anhand der Lokalisationsexperimente von HER2 in GM1-angereicherten Lipiddomänen abgeleitet werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass HER2 in 2D-Kultur mit GM1-angereicherten Lipiddomänen initial kolokalisieren kann, jedoch nach der Quervernetzung mit einem sekundären Antikörper gegen die Untereinheit B von Cholera toxin aus den GM1-angereicherten Lipiddomänen dissoziiert (Mocanu et al., 2005; Nagy et al., 2002). GM1 kann sowohl Bestandteil von planaren Lipiddomänen als auch von Caveola sein (Simons und Ikonen, 1997; Parton, 1994).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten 3D-Modell bleibt der Großteil von HER2 nach der Vernetzung eindeutig mit den Lipiddomänen kolokalisiert (Abb. 11), wohingegen die Ergebnisse für die 2D-Kultur bestätigt werden konnten. GM1 ist ein spezifischer Bestandteil von lipidreichen Mikrodomänen und sowohl GM1 also auch GM3 können die Homo- bzw. Heterodimerisierung von HER2 regulieren (Nagy et al., 2002; Sottocornola et al., 2003). Bisher konnte noch nicht eindeutig aufgeklärt werden wie Ganglioside die Dimerisierung von HER2 modulieren. Postuliert wird, dass HER2 in den Lipiddomänen angereichert wird, was die lokale Dichte der Rezeptoren erhöht und die Wahrscheinlichkeit einer Homo- oder Heterodimerisierung begünstigt (Nagy et al., 2002; Sottocornola et al., 2006). Welche Schlüsselfunktion Ganglioside in Zusammenhang mit der HER2-Aktivierung haben können hat die Behandlung der SKBR-3 Zellen mit den Gangliosidinhibitor [D]-PDMP gezeigt. Die Depletion der Ganglioside in 3D-Kultur führte zur Inhibition der HER2-Phosphorylierung, die jedoch nach Zugabe von GM3 wieder hergestellt werden konnte (Abb. 15B). Der Inhibitor zerstört nicht die Organisation der Lipiddomänen, da beispielsweise die Cholesterinsynthese nicht beeinträchtigt wird (Sottocornola et al., 2006). Welchen Einfluss Trastuzumab auf die Lokalisation von HER2 in den GM1-angereicherten Lipiddomänen hat ist noch unklar und bedarf weiterer Experimente.

Eine wichtige Beobachtung in Bezug auf eine Zelloberflächenrestrukturierung in den Sphroiden war auch die Herunterregulierung der Caveolin-1 Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 12 und 13). Allein die substratunabhängige Kultivierung der Zellen führte zu einem veränderten Genexpressionsmuster in den SKBR-3. Diese Beobachtung gewinnt an Bedeutung wenn man die Tatsache in Betracht zieht, dass Caveolin-1 in der Tumorbologie als Tumorsuppressor diskutiert wird (Razani et al., 2001). Die Untersuchungen von humanen Tumorproben und Tumorzelllinien ergab, dass Caveolin-1 in

den meisten Fällen nicht mehr nachweisbar war im Vergleich zu nicht-transformierten Geweben und Zelllinien (Razani et al., 2001; Sagara et al., 2004; Ravid et al., 2006). In vielen Fällen korreliert der Verlust der Caveolin-1 Expression mit mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer Metastasierung des Tumors (Burgermeister et al., 2008; Goetz et al., 2008).

Auf molekularer Ebene ist Caveolin-1 an der Regulation der Signaltransduktion beteiligt, da es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* HER2 negativ reguliert (Engelman et al., 1998; Park et al., 2005). Die Überexpression von Caveolin-1 in 3D-Kultur beeinflusst die Ausbildung von Sphroiden auf poly-HEMA beschichteten Platten und führt zu einer signifikanten Abnahme der HER2-Phosphorylierung (Abb. 14). Das bedeutet, dass Zellen die Caveolin-1 exprimieren nicht mehr substratunabhängig proliferieren können. Dem Tumor ermöglicht die Herunterregulierung von Caveolin-1 eventuell eine verstärkte Aktivierung von HER2, was auch die Beobachtungen im Punkt 3.1.3.1 erklären könnte (Abb. 8). Hinzu kommt, dass Podar und Kollegen die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit von PI3K an Caveolin-1 beschreiben, was zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Wegs führt (Podar et al., 2003). So könnte der Verlust an Caveolin-1 auch für die Herunterregulierung der Akt-Phosphorylierung in dem hier untersuchten 3D-Modell verantwortlich sein (Abb. 8A und B). Tatsächlich jedoch gibt es auch HER2-überexprimierende Zelllinien wie KPL-4 oder A431, die keine Abnahme der Caveolin-1 Expression in 3D zeigen (Abb. 13). Eine mögliche Erklärung dafür liefern Hinweise aus der Literatur, die erläutern, dass der Umfang der Caveolin-1 Herunterregulierung zwischen verschiedenen Tumorarten variieren kann und oft sehr stark an das Tumorstadium geknüpft ist (Goetz et al., 2008). Des Weiteren scheint es einen Zusammenhang zwischen der Caveolin-1 Expression und der Behandlung mit Zytostatika zu geben, da in humanen, zytostatikaresistenten Kolonkarzinomzellen eine erhöhte Expression von Caveolin-1 nachgewiesen werden konnte (Lavie, Fiucci, 1998). Möglicherweise könnte dies eine Erklärung für die unterschiedlichen Ansprechraten von SKBR-3 auf Trastuzumab in 2D- und 3D-Kultur erklären (Abb. 7).

Zusammenfasst kann man sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese von Caveolin-1 als wichtigen Modulator der HER2-Aktivität stützen. Mit Hilfe des 3D-Modells konnte ein Zusammenhang zwischen dem HER2-Aktivierungsstatus und der Reorganisation der Zelloberfläche hergestellt werden.

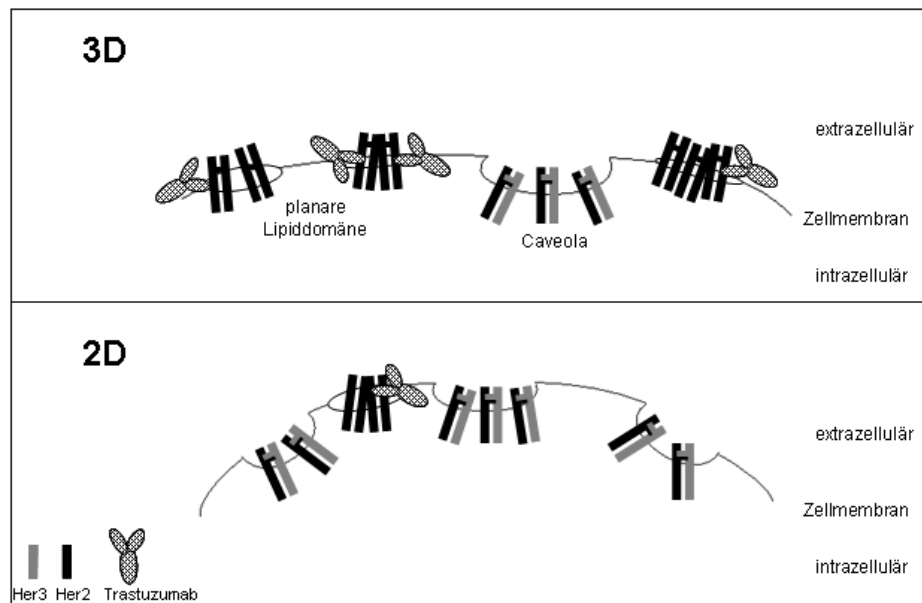


Abb. 27: Modell zur Beschreibung der Zelloberflächenrestrukturierung in 3D-Kultur. Verglichen mit einer 2D-Kultur existieren in einer 3D-Kultur weniger Caveola-Strukturen, die eine negative Regulation von HER2 begünstigen. Parallel dazu fördern die planaren Lipiddomänen die Akkumulation und Aktivierung von HER2-Homodimeren, die von Trastuzumab inhibiert werden können. Es wird vermutet, dass HER2/HER3-Heterodimere bevorzugt in Caveola lokalisieren. Dargestellt sind nur die Trastuzumab-Moleküle, die einen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation ausüben und nachgeschaltete Signalwege blockieren können.

Abbildung 27 beschreibt ein Modell, dass aufgrund der beobachteten Ergebnisse postuliert wurde. Das 3D-Modell repräsentiert eine geringere Anzahl an Caveola-Strukturen, so dass vorwiegend planare Lipiddomänen vorliegen (Abb. 27). Die Herunterregulierung von Caveolin-1 in 3D-Kultur führt zu einer stabilen Lokalisation der HER2-Rezeptoren in lipidreichen Mikrodomänen und begünstigt so die Homodimerisierung bzw. die Ausbildung von größeren HER2-Clustern und Phosphorylierung von HER2. Dies wiederum würde auch die erhöhte Ansprechrate von Trastuzumab im 3D-Modell erklären, da Trastuzumab nur in der Lage ist HER2-Homodimere zu inhibieren. Es ist nicht eindeutig klar ob Trastuzumab die Homodimerisierung von HER2 direkt inhibieren kann. Möglicherweise ist der Effekt von Trastuzumab auf die Inhibition einer HER2-Clusterausbildung zurückzuführen. In Abbildung 27 sind nur die Trastuzumab-Moleküle eingezeichnet, die einen proliferationsinhibitorischen Effekt auf die Zellen ausüben und nachgeschaltete Signalwege inhibieren können. Bezüglich der HER2-Lokalisation in Caveola im 2D-Kulturmodell wären noch weitere Untersuchungen erforderlich, die eindeutig bestätigen, dass vermehrt HER2/HER3-Heterodimere in den Caveola-Strukturen lokalisiert sind.

4.5 Die Rolle von DARPP-32 und t-DARPP bei der Resistenzentwicklung gegen Trastuzumab

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in 3D-Kultur eine Zelllinie (SKBR-3 HR) generiert, die resistent gegen die Behandlung von Trastuzumab ist. Bei der anschließenden Charakterisierung dieser resistenten Linie konnte die Hochregulierung von PPP1R1B (DARPP-32) beobachtet werden (Tab. 2).

DARPP-32 zeichnet sich durch seine Funktion als Kinase- und Phosphataseinhibitor in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungsstatus aus (Svenningsson et al., 2004). Die Phosphorylierung des Threoninrest 34 durch Proteinkinase A (PKA) konvertiert DARPP-32 in einen potenten Inhibitor der Proteinphosphatase 1 (PP1), wohingegen die Phosphorylierung des Threoninrest 75 mittels CDK5 (cyclin-dependent kinase 5) oder Cdc2 (cell division cycle 2) zur Inhibition der Proteinkinase A führt (Hemmings et al., 1984; Bibb et al., 1999). Diese Eigenschaft und die Tatsache, dass DARPP-32 im *her2*-Amplikon lokalisiert ist, lenkte den Fokus in dieser Arbeit auf die Charakterisierung von DARPP als potentiellen Resistenzmechanismus für Trastuzumab (Kauraniemi et al., 2003).

Darüberhinaus wurde die endogene DARPP Überexpression im Bereich der Onkologie bisher nur in humanen Tumormproben oder in *in vivo* Resistenzmodellen identifiziert. In Publikationen, welche potentielle Resistenzmechanismen gegen Trastuzumab in herkömmlichen 2D-Kulturmodellen beschreiben, ist DARPP-32 oder t-DARPP als möglicher Resistenzmarker nicht erwähnt.

Eine funktionelle Relevanz von DARPP-32 in Bezug auf die Tumorentstehung diskutierten 2002 erstmals El-Rifai und Kollegen. Sie konnten in Magenkarzinomen die Überexpression von DARPP-32, sowie die einer verkürzten Form namens t-DARPP, auf mRNA- und Proteinebene nachweisen, jedoch nicht in normalen Magenepithelzellen (El-Rifai et al., 2002). Die t-DARPP mRNA ist zwischen den Exons 2 bis 7 komplementär zu DARPP-32 und unterscheidet sich nur in der Sequenz des ersten Exons. Aufgrund dieser Sequenzeigenschaften fehlt t-DARPP die Phosphorylierungsstelle Thr 34 (El-Rifai et al., 2002). Mittlerweile konnte eine Überexpression von DARPP-32 auch in Adenokarzinomen der Brust, der Prostata und des Kolon aufgezeigt werden (Wang et al. 2005; Maqani et al., 2006; Kauraniemi und Kallioniemi, 2006). Die biologische Funktion und die damit verbundenen Signalwege in Bezug auf eine Krebsentstehung bzw. -progression sind jedoch bisher kaum erforscht. Ein potentieller Mechanismus beschreibt DARPP-32 und t-DARPP als antiapoptotische Regulatoren, die Tumorzellen einen gewissen Überlebensvorteil in Bezug auf die Behandlung mit Zytostatika verschaffen, bis hin zur Zytostatikaresistenz (Belkhir et

al., 2005). Vor kurzem konnten Belkhiri und Kollegen zudem in *in vitro* Experimenten zeigen, dass die Überexpression von t-DARPP in einer Trastuzumab resistenten Brustkrebszelllinie zur Hochregulierung des antiapoptotisch wirkenden Faktors Bcl-2 führt, welcher die Aktivierung der Enzyme Caspase-3 und Caspase-9 hemmt (Belkhiri et al., 2008). Der Komplex aus t-DARPP, HER2 und HSP90 blockiert den Effekt von Trastuzumab und t-DARPP reguliert außerdem die Aktivität von Akt und Bcl-2 in den resistenten Zellen (Belkhiri et al., 2008). Kritisch zu bewerten ist in diesem Fall jedoch, dass Belkhiri und Kollegen die potentielle Rolle des Vollängenproteins DARPP-32 in dieser Arbeit nicht kommentieren. Ob es sich bei Belkhiri und Kollegen auch um eine reversible Trastuzumab Resistenz handelt bleibt offen. Eigene Daten zeigen jedoch, dass die resistenten Zellen nach Inkubation ohne Trastuzumab im Medium nach einem gewissen Zeitraum wieder auf Trastuzumab ansprechen (Abb. 18). Dies beweist, dass sich die selektionierten Zellen nicht von einer Subpopulation, die DARPP-32 überexprimiert, ableiten. Die Zellen scheinen die Proteinexpression von DARPP-32 bzw. t-DARPP in Abhängigkeit von Trastuzumab zu regulieren.

Fakt ist, dass sowohl DARPP-32 also auch t-DARPP in den untersuchten Tumorproben nachgewiesen werden konnte (Abb. 23). Jedoch hat die rekombinante Überexpression der Proteine in der parentalen Zelllinie SKBR-3 zu keiner Resistenz gegen Trastuzumab geführt (Abb. 25). Vergleicht man die DARPP Expression in den rekombinanten Linien mit der in der resistenten Zelllinie SKBR-3 HR, dann fällt auf, dass die rekombinanten Zelllinien DARPP nur sehr schwach exprimieren und auch Bcl-2 nicht induziert werden konnte (Abb. 24). Die Selektion von Zellklonen, die eine besonders hohe Proteinexpression aufweisen, hätte möglicherweise ein anderes Ergebnis erzielt. Außerdem wurde DARPP-32 und t-DARPP jeweils separat in den Zellen exprimiert, wohingegen die resistente Linie SKBR-3 HR beide Formen in hohem Maß aufweist. Auch bei den humanen Tumorproben waren bis auf zwei Fälle beide DARPP-Formen nachweisbar (Abb. 23).

Mit Hilfe des Tyrosinkinaseinhibitors Lapatinib konnte gezeigt werden, dass es sich um keinen generellen Resistenzmechanismus handelt (Abb. 26). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zellen nach wie vor auf eine HER-vermittelte Signalaktivierung angewiesen sind und somit keine Entkopplung des Akt-Signalwegs, trotz DARPP Überexpression, stattgefunden hat.

Aufgrund der geringen Anzahl an Forschungsergebnissen über den Zusammenhang der DARPP-32 Expression und der Entstehung bzw. Progression eines Tumors ist die genaue Funktion des Proteins noch sehr unklar. Hinzu kommt, dass eine Studie von humanen

Ösophaguskarzinomen vor einiger Zeit darauf hinwies, dass die Patienten, deren Tumor DARPP-32 exprimierte, eine bessere Prognose hatten als solche, deren Tumor negativ für DARPP-32 war (Ebihara et al., 2004). Um eine Aussage über die klinische Relevanz von DARPP-32 und t-DARPP in Bezug auf die Ansprechrate bei der Behandlung von Tumorkranken mit Trastuzumab zu bekommen, wären retrospektive Analysen von klinischen Studienproben sehr hilfreich.

4.6 HER3 als Hauptmediator der Trastuzumab Resistenz

Die Charakterisierung der HER-Rezeptortyrosinkinasen in der Trastuzumab resistenten SKBR3-HR zeigte, dass im Vergleich zur parentalen Zelllinie die Gesamtmenge an HER2 und HER3 Protein und deren Phosphorylierungsstatus zugenommen hatte (Abb. 21). Dass die erhöhte HER2-Expression mit einer Zunahme der HER2-Moleküle auf der Zelloberfläche korreliert, konnte im Durchflusszytometer nachgewiesen werden (Abb. 19). Bei der nachfolgenden Analyse der assoziierten Signalweiterleitungswege war eine verstärkte Expression der regulatorischen Untereinheit p85 von PI3K und die Phosphorylierung von Akt in der resistenten Linie zu beobachten (Abb. 21). Verknüpft man nun die Ergebnisse, so stützen diese zunehmend die Theorie, dass die resistenten Zellen offenbar aktiv den HER3-vermittelten PI3K/Akt-Weg hochregulieren und somit möglicherweise die Inhibition des MAPK-Wegs kompensieren, was zu einer kontinuierlichen Proliferation der Trastuzumab resistenten Zellen führt. Bei der Behandlung der resistenten Zellen mit Trastuzumab wurde eine leichte Abnahme des HER2-Phosphosignals beobachtet, jedoch keine Veränderung des Phosphosignals bei HER3 und Akt (Abb. 21). Die Phosphorylierung von MAPK konnte nach wie vor durch Trastuzumab herunterreguliert werden. Es ist allgemein bekannt, dass Trastuzumab nur HER2-Homodimere inhibieren kann. Die Daten lassen vermuten, dass ein Teil der HER2 Moleküle noch als Homodimere vorliegen, deren Signalweiterleitung durch Trastuzumab inhibiert werden kann. Parallel dazu kommt es in den resistenten Zellen jedoch vermehrt zur Ausbildung von HER2/HER3-Heterodimeren, was schließlich die erhöhte Phosphorylierung von Akt erklären könnte. Die Ergebnisse aus den Kopräzipitationsexperimenten beweisen das Vorkommen von HER2/HER3-Heterodimeren in den resistenten SKBR3-HR, sowie eine direkte Assoziation von PI3K p85 mit HER2/HER3 (Abb. 22). Da bei der Analyse des Genexpressionsprofils keine verstärkte Expression von Heregulin nachgewiesen werden konnte, kann von einer ligandenunabhängigen Aktivierung des HER2/HER3-Komplexes ausgegangen werden. Die Flexibilität der HER-Dimerisierungspartner und deren Dynamik in der Signalweiterleitung haben auch Sergina und Kollegen eindrucksvoll beschrieben (Sergina et al., 2007). HER3

kann die Inhibition von HER2 durch einen Rückkopplungsmechanismus über Akt puffern, so dass die Tumorzellen den pro-apoptotischen Signalmechanismen einer Behandlung mit HER2-TKIs entkommen können. Die Analyse von HER2-positiven Tumorbiopsien zeigte, dass nach der Behandlung mit Lapatinib die MAPK-Phosphorylierung unterdrückt wurde jedoch nicht die Akt Aktivierung (Spector et al., 2005). Das führt zu der Annahme, dass eine Inhibition von HER2 alleine nicht ausreicht um die Proliferation der Tumorzellen zu unterdrücken. Vielleicht steht diese Beobachtung in Zusammenhang mit der Tatsache, dass von den 25-30% HER2-positiven Brustkrebspatientinnen nur ein Teil auf die Therapie mit Trastuzumab anspricht (Vogel et al., 2001)

Die kürzlich veröffentlichten Daten einer klinischen Studie, bei der Brustkrebspatientinnen neoadjuvant mit Trastuzumab behandelt wurden, liefern den Hinweis, dass der Expressionsstatus von HER3 einen Einfluss die Ansprechrate des Tumors auf Trastuzumab hat (Gianni et al., 2008). Die Bedeutung von HER3 als Biomarker bedarf weiterer klinischer Studien, die eine signifikante Korrelation von Expression und Ansprechrate bestätigen.

Von einem evolutionsbiologischem Standpunkt aus betrachtet ist das Fehlen einer Kinasedomäne bei HER3 ein Vorteil. HER3 kann beispielsweise nicht durch klassische Tyrosinkinaseinhibitoren inaktiviert werden, dient jedoch als Substrat von HER2 und EGFR und wirkt als Gerüstprotein für die Rekrutierung von Adapter- und Signalmolekülen. Die Entwicklung eines Inhibitors für HER3 stellt deshalb eine Herausforderung für die pharmazeutische Industrie dar.

Eine Interaktion von HER2 mit IGF-1R oder MUC-4, wie sie in der Literatur als mögliche Resistenzmechanismen beschrieben werden, konnte in eigenen Kopräzipitationsexperimenten (Daten nicht gezeigt) nicht nachgewiesen werden (Price-Schiavi et al., 2002; Nahta et al., 2005).

4.7 Genexpressionsprofile spiegeln Komplexität der Trastuzumab-Resistenz wider

Vergleicht man die Genexpressionsprofile der parentalen SKBR-3 Linie mit der resistenten SKBR-3 HR, so stellt sich die Frage, ob tatsächlich ein einziges Molekül für die Entwicklung einer Resistenz gegen Trastuzumab verantwortlich sein kann. Bei SKBR-3 HR war die Expression von 790 Genen hochreguliert und die von 654 Genen herunterreguliert (3.2.2.2). Mit Hilfe einer Software wurden die Expressiondaten im Bezug auf ihre Assoziation mit Krebs und HER2 bewertet. Verschiedene Forschungsteams haben umfassende und genomweite Expressionsanalysen durchgeführt und prognostische Genexpressionssignaturen definiert (Haibe-Kains et al., 2008). Beispielsweise konnte anhand von Expressionsprofilen und dem klinischen Therapieerfolg bei Brustkrebspatientinnen eine 70-Gen- (van't Veer et al.,

2002) und eine 76-Gen-Signatur formuliert werden (Wang et al., 2005). Basierend auf dieser Signatur konnten bereits größere Gruppen an risikoarmen Brustkrebspatientinnen identifiziert werden, die dementsprechend eine weniger aggressive Chemotherapie bekamen. Kritische Stimmen jedoch weisen darauf hin, dass derartige Signaturen nur für eine Subpopulation erfolgversprechend sind und noch keine breite Anwendung finden (Haibe-Kains et al., 2008). Ergebnisse wie diese verdeutlichen, dass höchst wahrscheinlich auch bei der Trastuzumab resistenten Linie SKBR-3 HR nicht nur ein Protein, wie beispielsweise DARPP-32, für die Resistenz verantwortlich ist. Eventuell würde eine multivariate Analyse von Genexpressionsprofilen einer statistisch signifikanten Patientenpopulation, die nicht oder nur schwach auf Trastuzumab anspricht, einen tieferen Einblick in die komplexen Signalwege ermöglichen. Eine sinnvolle Interpretation von Expressionsdaten ist ohne Bioinformatik schwer vorstellbar. Die fortschreitende Aufklärung von Signalwegen wird helfen die erzeugten Datenmengen in Zukunft besser verstehen und deuten zu können.

Eine Verifizierung der Ergebnisse aus dem Genexpressionsprofil in siRNA Experimenten war leider nicht durchführbar, da es nicht möglich war die resistenten Zellen zu transfizieren. Hier müsste ein Ansatz basierend auf einer retroviralen Transduktion von shRNA gewählt werden, um mehr Einsicht in die funktionellen Zusammenhänge der hoch- bzw. herunterregulierten Gene bei SKBR-3 HR zu bekommen.

5 Ausblick

Die Ergebnisse aus dieser Doktorarbeit haben gezeigt, dass sich aufgrund der unterschiedlichen Kulturbedingungen beachtliche Unterschiede in der Organisation der Zelloberfläche und der Aktivierung von Signalwegen ergeben. Das in dieser Arbeit beschriebene 3D-Modell liefert Ergebnisse, die auf dem Hintergrund einer substrat- und ECM-unabhängigen Spheroidausbildung beruhen. Diese Methode stellt ein sehr einfaches System dar Zell-Zell-Kontakt und die daraus resultierenden Signalkaskaden zu studieren. Ein weitaus komplexeres Modellsystem stellen Kokulturen aus Tumorzellen und Fibroblasten dar. Dieses *in vitro* Modell reflektiert die physiologische Umgebung eines Tumors in der Tat umfassender, ist jedoch gleichzeitig aufwendiger und komplizierter in der Handhabung und Interpretation.

Klar ist, dass die Etablierung der dreidimensionalen Zellkultur in der Zellbiologie zukünftig neue Einblicke in Tumorentstehung und- progression liefern wird und somit als Hilfsmittel für die Identifizierung von neuen Zielmolekülen in der Krebstherapie dienen kann. Die Adaption des 3D-Systems auf eine Hochdurchsatzplattform ermöglicht außerdem eine

schnelle und umfassende Analyse der Spheroide beispielsweise bei Proliferationsexperimenten oder siRNA Ansätzen.

6 Materialien und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Casy TTC Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Elektrophoreseapparatur	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresekammern	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ELISA Plattenlesegerät Spectra Fluor Plus	Tecan, Crailsheim
ELISA Plattenlesegerät Image Spectra Rainbow	Tecan, Crailsheim
FACscan	Becton Dickinson, San Jose, USA
Lumi-Imager	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop Axiovert135	Zeiss, Jena
Heizbares Schüttelgerät SH26	CAT, Staufien
Kleinschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Kühlbare Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Labovort	Leitz, Wetzlar
LightCycler® Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikrotom	Leika, Bensheim
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
pH Meter inoLab	WTW, Wien
Pyramitom Modell11800	LKB, Bromma, Schweden
Slow-Scan-CCD-Kamera Typ TEM1010	Tietz TVIPS GmbH, Gauting
Sterilwerkbank	BDK, Reutlingen
Stromversorgungseinheit PowerEase 500	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trimmfräse TM 60	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Waage Sartorius BP 2100	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad Precitherm PFV	Clinicon International

6.1.2 Reagenzien

[D]-PDMP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Alexa Fluor ® 488 Lipid Raft Labeling Kit	Molecular Probes, Eugene, USA
anti-ErbB2 Affibody® Molecule (ab31892)	Abcam, USA

Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
BCA-200 Protein Assay Kit	Pierce, Bonn
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BSA Standard	Pierce, Bonn
Casyton-Lösung	Schärfe-System, Reutlingen
CellTiter Glo®	Promega, USA
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Eukitt	Fluka, Taufkirchen
Formaldehyd-Lsg.	Merck, Darmstadt
FuGene6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
G418	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gel/Mount™	Abcam, USA
Glycin	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂ , 30 % (Perhydrol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Histomount	Shandon, Frankfurt
Lapatinib	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Matrigel	BD Biosciences, Bedford MA
Methanol	JT Barker & Sons Ltd.,UK
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10%	Biorad, München
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium- <i>ortho</i> -vanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P40	Fluka, Taufkirchen
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE LDS Probenpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE MES SDS Laufpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
OPTI-MEM	GIBCO-BRL, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin (45 U/ml) Streptomycin (45 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepstatin	Fluka, Taufkirchen
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-HEMA (Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) 12% in Ethanol	Polysciences, Eppelheim
Ponceau Red	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Qiashredder	Qiagen, Hilden
RNA Amplification Kit SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH,
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypan-Blau	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tween 20	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Xylol	Merck, Darmstad

6.1.3 Standardpuffer

Eosin-Lösung (1 %)	14.5 mM Eosin, 0.15% (v/v) Eisessig
Hämalaun nach Mayer	5.2 mM Citronensäure, 3.3 mM Hämatoxylin, 1 mM NaI, 105 mM KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O, 302 mM Chloralhydrat
Lysepuffer für Zellen (pH 7,5)	50 mM Tris/HCl, 150 mM Natriumchlorid, 1% (w/v) NP40, 0.5% (w/v) Natriumdesoxycholat, 1

	mM EDTA, 2 mM Natriumorthovanadat, 10 mM Natriumpyrophosphat, 100 mM Natriumfluorid, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 10 µl/ml gesättigte PMSF Lsg. (Ethanol)
Lysepuffer für Tumorproben (pH 7,5)	50 mM Hepes, 150 mM Natriumchlorid, 1.5 mM Magnesiumchlorid, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM EGTA, 10% (w/v) Glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, 10 µl/ml gesättigte PMSF Lsg. (Ethanol), 10 µg/ml Aprotinin, 2 mM Na ₃ VO ₄
Lysepuffer für IP (pH 7,5)	50 mM Tris/HCl, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (w/v) Triton X-100, 2 mM Natriumorthovanadat, 10 mM Natriumpyrophosphat, 100 mM Natriumfluorid, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 10 µl/ml gesättigte PMSF-Lsg. (Ethanol)
Permeations-/Blockierungspuffer	1xPBS, 10 % FKS, 0,1 % Triton X-100
Poly-HEMA Lösung	4,2 ml Poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) 12% in Ethanol, 5,0 ml H ₂ O, 90,8 ml Ethanol
Ponceau S Solution	0,1% (w/v) Ponceau S in 0,5% (v/v) Essigsäure
Semi Dry Transferpuffer (pH 7,4)	50 mM Tris/HCl, 40 mM Glycin, 0.04 % (v/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
TBS-T (pH 7,4)	10 mM Tris/HCl, 150 mM Natriumchlorid, 0,05% (v/v) Tween 20
Trastuzumab Puffer (pH 6,0)	5 mM Histidine, 60 mM Trehalose, 0,1 mg/ml Polysorbate 20
Waschpuffer für IP (pH 7,5)	50 mM Tris/HCl, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% (w/v) Triton X-100, 2 mM Natriumorthovanadat, 10 mM Natriumpyrophosphat, 100 mM Natriumfluorid, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 10 µl/ml gesättigte PMSF-Lsg. (Ethanol)

Waschpuffer für IF

1xPBS, 10 % FKS, 0,05 % Triton X-100

Zinklösung

3.5 mM Calciumacetat, 36.7 mM

Zinkchlorid, 27.2 mM Zinkacetat, 100 mM

Tris-HCl

6.1.4 Antikörper

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper, deren Bezugsquelle und Verdünnung.

Antikörper	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
Akt	Cell Signaling	9272	1:500
Alexa 488 konjugiertes Ziege anti-Human IgG	Molecular Probes	A-11013	1:200
Alexa Fluor® 594 konjugiertes Ziege anti-Human IgG	Molecular Probes	A-11014	1:200
Bcl-2	BD Biosciences	610539	1:500
Caveolin-1 N-20	Santa Cruz Biotechnology	sc-894	1:250
CD71	Santa Cruz	sc-32272	1:500
DARPP-32 (H-62)	Santa Cruz	sc-11365	1:500
DARPP-32 EP721Y	Epitomics	1711-1	1:100
EGFR	Upstate Biotechnology	06-847	1:1000
Grb2	Upstate Biotechnology	05-372	1:500
HER2/neu	Dako	A0485	1:1000
HER3	Cell Signaling	4754	1:500
HIF-1 α	Cell signaling	3716	1:1000
Human IgG	Jackson Immuno Research	009-000-003	siehe Experiment
Kaninchen IgG	R&D	AB-105-C	siehe Experiment
Integrin β 4 (H-101)	Santa Cruz	sc-9090	1:500
Lyn	Santa Cruz	sc-15	1:500
MAPK	Cell Signaling	9102	1:250
MEK1/2	Cell Signaling	9126	1:1000
PAK1	Cell Signaling	2602	1:1000
PAK2	Cell Signaling	2608	1:1000
Phospho-Akt S473	Cell Signaling	9271	1:500
Phospho-EGFR Y1173	Epitomics	1124-1	1:1000
phospho-HER2/neu Y1248	Biosource	44-900	1:1000
phospho-HER3 Y1289	Cell Signaling	4791	1:500
phospho-MAPK T202/Y204	Cell Signaling	9101	1:1000
Phospho-MEK1/2 S217/221	Cell Signaling	9121	1:500
Phospho-PAK1/2 S144/S141	Cell Signaling	2606	1:1000
PI3K	Upstate Biotechnology	06-497	1:500
P-Integrin β 4 (Y1526)	Abcam	ab29044	1:250
P-PAK1 Ser144/PAK2Ser141	Cell Signaling	2461	1:1000
Rac1	chemicon	MAB3735	1:1000
Shc	BD Biosciences	610879	1:250
Trastuzumab	Roche Diagnostics	---	siehe Experiment
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Peroxidase-gekoppelt	Bio-Rad	170-6519	1:500
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Peroxidase-gekoppelt	Bio-Rad	170-6515	1:500

6.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried/München) hergestellt.

Caveolin-1 FW	5'- AGA AAG AAG ATG GGG GAG GA -3'
Caveolin-1REV	5'- AAA GTC CCC AAA GGC AGA AT -3'
DARPP-32 FW	5'- ACA GGG CAG GAC CCT AAG AT -3'
DARPP-32 REV	5'- AAG AGG TCT CTG CCA GTC CA -3'
β-Aktin FW	5'-TGC TTC TAG GCG GAC TAT GAC -3'
β-Aktin REV	5'-TGG CAA GGG ACT TCC TGT AAC-3'

6.1.6 Zelllinien

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Tumorzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Medium
SKBR-3	Adenokarzinom – Brust	ATCC (HTB-30)	McCoy's 5A +10% FKS +2 mM L-Glutamin
SKOV-3	Adenokarzinom – Ovar	Roche, Nutley	McCoy's 5A +10% FKS +2 mM L-Glutamin
KPL-4	Adenokarzinom – Brust	Roche, Kamakura	DMEM +10% FKS +2 mM L-Glutamin
BT474	ductales Adenokarzinom – Brust	ATCC (HTB-20)	McCoy's 5A +10% FKS +2 mM L-Glutamin
A431	Epidermoidkarzinom - Haut	ATCC (CRL-1555)	DMEM +10% FKS +2 mM L-Glutamin
Calu-3	Adenokarzinom - Lunge	ATCC (HTB-55)	Eagle's MEM +10% FKS +2 mM L-Glutamin + 1 mM Natriumpyruvat + 0,1 mM NEAA
MDA-MB-468	Adenokarzinom - Brust	ATCC (HTB-132)	RPMI +10% FKS +2 mM L-Glutamin
SKBR-3 HR	Trastuzumab resistente Adenokarzinomzelllinie - Brust	selbst generiert im Rahmen dieser Arbeit	McCoy's 5A +10% FKS +2 mM L-Glutamin +45 U/ml Penicillin +45 µg/ml Streptomycin
SKBR-3 HR-	revertiere Adenokarzinomzelllinie - Brust	selbst generiert im Rahmen dieser Arbeit	McCoy's 5A +10% FKS +2 mM L-Glutamin +45 U/ml Penicillin +45 µg/ml Streptomycin

6.1.7 Zellkulturbedarf

6-, 24-, 96-Napfplatten	Greiner, Frickenhausen
	Corning Inc. Costar, Wiesbaden
Accutase	PAA, Laboratories GmbH, Innsbruck
DMEM	PAA, Laboratories GmbH, Innsbruck
Eagle`s MEM	PAN, Aidenbach
Einfrierröhrchen, 1.8 ml	Nalgene, NY, USA
FBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HEPES	Gibco-BRL, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
McCoy´s 5A	Gibco-BRL, Karlsruhe
Na-Pyruvat	Gibco-BRL, Karlsruhe
Non-essentiell amino acids NEAA	Gibco-BRL, Karlsruhe
PBS	PAN, Aidenbach
RPMI	PAA, Laboratories GmbH, Innsbruck
Zellkulturflaschen, T25, T75, T175	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten	BD Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Corning Inc. Costar, Wiesbaden

6.1.8 Verbrauchsmaterial

Criterion Size Blotting Papier	Bio-Rad Laboratories
Eindeckgläser 24 x 60 mm	Diagonal, Münster
Einmalspritzen (1ml)	Braun, Kronberg
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg
LightCycler® Kapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Nagellack	Astor, Zug, Schweiz
Nitorzellulose WesternBlotting Membran	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Parafilm M	American Nat. Can, Greenwich, USA
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Safe Seal Tips Premium 2.5 –1000 µl	Biozym, Hess Oldendorf

6.1.9 Hard- und Software

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Software Microsoft Word 2003 (Microsoft Corp.) angefertigt. Die Bilder der Westernblots wurden mit der Software LumiAnalyst Version 3.1 digitalisiert. Die Weiterverarbeitung der Graphiken erfolgte mit dem Programm Jasc Paint Shop Pro 9.

Literatur- und Datenbankrecherchen wurden mit Hilfe des Internetservices des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Die Analyse der Genexpressionsdaten erfolgte mit der Software Ingenuity Pathway Analysis von Ingenuity System.

6.2 Methoden

6.2.1 Zellbiologische Methoden

6.2.1.1 Zellkultur

Die verwendeten Tumorzelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in mit 10 % FKS und 2 mM L-Glutamin supplementierten Medium kultiviert. In Tabelle 5 sind die verwendeten Medien den jeweiligen Zelllinien zugeordnet. Die Trastuzumab resistente Zelllinie SKBR-3 HR und die Linie SKBR-3 HR- wurden außerdem in Gegenwart von 45 U/ml Penicillin und 45 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert, um eine konstante subkonfluente Kultur (60-70% Zelldichte) zu erhalten. Zur Passagierung und Ernte adhärenter Zellkulturen wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Accutase für 10 - 20 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die abgelösten Zellen in der Flasche mehrmals resuspendiert wurden, wurden sie in eine neue Zellkulturflasche eingesät oder die Zellen wurden alternativ für weitere Analysen pelletiert (950 rpm, 5 min), 1x PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung im -80 °C Gefrierschrank gelagert.

6.2.1.2 Herstellung von Spheroidkulturen (3D-Kulturen)

Für die Oberflächenbeschichtung von 6- und 96-Napfplatten wurde eine 0,5 %ige Poly-HEMA Lösung in Ethanol (95 %) hergestellt. In die 6-Napfplatten wurden 3 ml und in die 96-Napfplatten wurden 100 µl poly-HEMA Lösung pipettiert. Die Platten wurden mit geschlossenem Deckel anschließend 3-5 Tage bei 37 °C im Trockenraum getrocknet und bei RT im Dunkeln gelagert. Vor Benutzung der beschichteten Platten wurden diese mit PBS

gewaschen. Entsprechend der Experimente wurden die Zellen wie in Tabelle 6 beschrieben in die Zellkulturplatten ausgesät.

Im Fall von A431 wurde zum Medium zusätzlich Matrigel mit einer Endkonzentration von 0,3 µg/µl gegeben, um die Spheroidebildung zu induzieren. Bei Matrigel handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen Extrakt von Proteinen der Basallamina, die von dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor sekretiert werden. In Tab. 6 sind die Zellzahlen für die jeweiligen Linien zusammengefasst.

Die Morphologie der Spheroide wurde im Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena) beurteilt und für Dokumentationszwecke wurden Bilder mittels CoolSNAP K4 Kamera (Visitron Systems, München) aufgenommen und mit der Software MetaMorph Version 7.0r3 analysiert. Die Größe der Spheroide wurde mit einem Kalibrator der Firma Zeiss bestimmt.

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Zellzahlen für die Proliferations- und Western Blot-Experimente

Zelllinie	96-Napfplatte		6-Napfplatte	10 cm
	Zellzahl /Napf			Kulturschale
	2D	3D	3D	2D
SKBR-3	6x10 ³	1.2x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
SKBR-3 HR	---	1.2x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
SKBR-3 HR-	---	1.2x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
SKOV-3	4x10 ³	1.5x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
KPL-4	---	1.0x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
BT474	---	1.2x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
A431	---	1.0x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
Calu-3	---	1.2x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
MDA-MB-468	---	1.5x10 ⁴	2x10 ⁵	5x10 ⁵
Inkubationsvolumen	100 µl	100 µl	3 ml	10 ml

6.2.1.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen geerntet, in ein 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 950 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1-2 mL vorgekühltem Einfriermedium (fötales Kälberserum mit 7,5% DMSO) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und 5x10⁶ Zellen pro 1 mL Einfriermedium in ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurden für ca.

zwei Tage bei -80 °C gelagert und anschließend in einem Flüssigstickstofftank bei -196 °C aufbewahrt.

6.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Generationszeit eukaryotischer Zellen

Die Bestimmung der Zellkonzentration einer Einzelzellsuspension erfolgte nach geeigneter Verdünnung in Casyton-Lösung unter Verwendung des Casy TTC Zellzählgeräts. Um das *in vitro* Wachstum einer Zelllinie zu bestimmen, wurde die Generationszeit G der Zellpopulation mit folgender Formel bestimmt: $G = t/n$ wobei t der Zeitraum zwischen zwei Messungen und n die Generationszahl ist; Die Generationszahl n berechnet sich dabei wie folgt: $n = \log N(t) - \log N_0 / \log 2$; $N(t)$ = Zellzahl zum Zeitpunkt t , N_0 = Zellzahl zu Beginn der Messung.

6.2.1.5 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Kultur wurde das Zellviabilitätsreagenz von Promega (CellTiter-Glo® Luminescent) verwendet. Dieser Test basiert auf der Bestimmung des ATP-Gehalts aus stoffwechselaktiven Zellen, der direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist. Um die Zellviabilität zu Bestimmen wurde nach der entsprechenden Inkubationszeit laut Hersteller direkt zum Medium CellTiter-Glo im Verhältnis 1:1 pipettiert. Für SKOV-3 wurde ein Verhältnis von 1:1.2 gewählt. Der Inhalt wurde auf einem Schüttler gemixt und die Spheroide durch auf- und abpipettieren resuspendiert und lysiert. Nach der Entfernung von Luftblasen wurde die Lumineszenz am Spectrafluor Plus Plattenlesegerät gemessen.

6.2.1.6 Viabilitätsanalyse mittels Hoechst 33342

Eine weitere Methode zur Analyse der Viabilität von Zellen, ist das Färben mit Hoechst 33342. Dabei handelt es sich um einen blau-fluoreszierenden Kontrastfarbstoff, der die Zellwand lebender Zellen durchdringt und an doppelsträngige DNA bindet. Für diese Viabilitätsmessung wurden wie zuvor beschrieben Zellen auf poly-HEMA beschichtete 96-Napfplatten ausgesät und jeweils ohne und in Gegenwart von 10 µ/ml Trastuzumab inkubiert. Nach 24 h, 3 d, 5 d und 7 d erfolgte jeweils die Analyse einer Platte. Dazu wurden Hoechst 33342 mit einer Endkonzentration von 10 µg/mL zum Medium pipettiert und die Zellen für weitere 15 min im Brutschrank inkubiert. Die Lokalisation der Hoechst 33342-positiven Zellen wurde anschließend mit dem automatisierten konfokalen Fluoreszenzmikroskop ImageXpress®5000A (Molecular Devices) in 4facher Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software MetaXpress™ (Molecular Devices).

6.2.1.7 Nachweis von nekrotischen Zellen innerhalb der Spheroide

Zellen wurden wie zuvor beschrieben auf poly-HEMA beschichtete 96-Napfplatten ausgesät und für 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde Propidiumiodid (PI) mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml zum Medium hinzupipettiert und die Spheroide wurden für weitere 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Lokalisation der PI-positiven Zellen wurde schließlich im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

6.2.2 Immunzytochemie

6.2.2.1 Subzelluläre Lokalisation von Proteinen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden 4×10^4 Zellen/Napf in eine 12-Napfplatte auf Deckgläschen ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, 1x mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen anschließend für 30 min mit 4% Formaldehyd in PBS auf Eis fixiert. Um temperaturabhängige Färbe-Artefakte zu vermeiden, wurden auch alle weiteren Schritte auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt. Nach Fixation der Zellen wurde 2x mit PBS gewaschen und für 30 min mit Permeations-/Blockierungspuffer inkubiert (PBS, 10 % FKS, 0,1 % Triton X-100). Nachfolgend wurden die permeabilisierten Zellen 1x mit Waschpuffer (PBS, 10 % FKS, 0,05 % Triton X-100) gewaschen und für 60 min bei RT auf einem Schüttler mit Primärantikörper (Verdünnung in Medium/10% FKS) inkubiert. Ungebundene primäre Antikörpermoleküle wurden nachfolgend in zwei Waschschritten mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde für 60 min mit sekundärem Antikörper (Verdünnung in Medium/10% FKS) inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit Waschpuffer wurden die Zellkerne mit DAPI (2 µg/ml) angefärbt. Im Anschluss an zwei weitere Waschschriffe wurde das Präparat in Gel/MountTM-Medium eingebettet und auf einem Objektträger fixiert, wobei das Deckgläschen an den Rändern mit Nagellack fixiert wurde. Die Proben wurden bei -20 °C im Dunkeln gelagert und innerhalb einer Woche mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiophot bei 100facher Vergrößerung analysiert. Die Bildanalyse erfolgte analog zu 6.2.1.2.

6.2.2.2 Färben der lipidreichen Mikrodomänen

Für die 2D-Kultur wurden 4×10^4 Zellen/Napf in eine 12-Napfplatte auf Deckgläschen ausgesät und für die 3D-Kultur wurden Zellen auf eine poly-HEMA beschichtete 6-Napfplatte ausgesät. Beide Ansätze wurden 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellaggregate einer 6-Napfplatte wurden vereinigt. Die Färbung der Lipiddomänen erfolgte laut Hersteller (Alexa Fluor® 488 Lipid Raft Labeling Kit, Molecular Probes). Um temperaturabhängige Färbe-Artefakte zu vermeiden, wurden auch alle weiteren Schritte auf Eis und mit eisgekühlten

Lösungen durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3% Paraformaldehyd für 15 min fixiert und zweimal mit 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 20 µg/ml Trastuzumab (Verdünnung in Medium/10% FKS) für 30 min inkubiert, dreimal mit 1xPBS gewaschen und mit einem konjugierten Fluor® 594 sekundären anti-Human IgG Antikörper (Verdünnung in Medium/10% FKS) für weitere 30 min inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 1xPBS wurden die Zellkerne mit DAPI (1µg/ml) während 1 min gefärbt. Im Anschluss an zwei weitere Waschschrritte wurde das Präparat in Gel/MountTM-Medium eingebettet und auf einem Objektträger fixiert, wobei das Deckgläschen an den Rändern mit Nagellack fixiert wurde. Die Proben wurden bei -20 °C im Dunkeln gelagert und innerhalb einer Woche mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS SP2), ausgestattet mit einem Argon und HeNe-Ionen Laser, analysiert. Alexa 488 wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das Emissionsspektrum wurde mit einem 495-550 nm Bandpassfilter aufgenommen. Alexa 594 wurde mit einer Wellenlänge von 594 nm angeregt und das Emissionsspektrum mit einem 600-670 nm Bandpassfilter detektiert. Die Proben wurden mit einem 100x Objektiv (1.46 numerische Apertur) beurteilt. Mit Hilfe der Leica Confocal Software 6.0 wurden Bilder der Größe 1024x1024 Pixel aufgenommen und mit der Software MetaMorph Version 7.0r3 (Molecular Devices) verarbeitet. Die Größe der Zellen wurde mit der Kalibrierungssoftware von MetaMorph bestimmt.

6.2.3 Durchflusszytofluorimetrie

6.2.3.1 HER2-Oberflächenexpression

Für die Bestimmung der HER2-Oberflächenexpression wurden die Spheroide aus vier Näpfen eine 6-Napfplatte vereinigt und bei RT für 5 min bei 950 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 1xPBS (37°C) gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellaggregate in 3 ml Accutase für 30 min im Inkubator resuspendiert und vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Danach wurde die Zellsuspension bei 4°C für 5 min bei 950 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit kalten 1xPBS gewaschen und durch ein feinmaschiges Filternetz in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen für 30 min auf Eis mit 20 µg/ml Trastuzumab (Verdünnung in Medium/10% FKS) inkubiert, mit 1xPBS gewaschen und für weitere 30 min mit dem sekundären, Alexa 488 konjugierten, Ziege Anti-Human IgG (Verdünnung in Medium/10% FKS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen, in 300 µl Medium resuspendiert und mit dem FACSScan Durchflusszytometer gemessen. Für die

Analyse wurden 10000 Zellen gemessen und zur Auswertung herangezogen (Cell Quest Version 3.3 Software).

6.2.3.2 Bestimmung der GM1-Expression nach [D]-PDMP Behandlung

Die Zellen wurden für 4 Tage in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen [D]-PDMP in 2D-Kultur inkubiert. Um die Effizienz der Gangliosid-Biosynthese zu überprüfen wurde ein Teil der Zellen, die mit 40 μM [D]-PDMP inkubiert wurden, für die Bestimmung der GM1-Expression im Durchflußzytometer verwendet. Hierzu wurden die Zellen mittels Accutase von den 10 cm Zellkulturplatten abgelöst und zentrifugiert (4°C, 5 min, 950 rpm). Die Färbung von GM1 erfolgte laut Hersteller (Alexa Fluor® 488 Lipid Raft Labeling Kit, Molecular Probes). Anschließend wurden die Zellen in 300 μl Medium resuspendiert und mit dem FACScan Durchflußzytometer gemessen. Für die Analyse wurden 10000 Zellen gemessen und zur Auswertung herangezogen.

6.2.4 Molekularbiologische Methoden

6.2.4.1 RNA-Isolierung

6.2.4.1.1 Extraktion von Gesamt-RNA

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA wurde das Qiagen Rneasy Kit verwendet. Die gesamte RNA-Aufreinigung wurde laut Herstellers bei Raumtemperatur durchgeführt. Spheroide aus einer 6-Napfplatte wurden vereinigt und zentrifugiert (950 rpm, 5 min), mit 1xPBS gewaschen und in 400 μl RLT-Puffer direkt lysiert. Für die 2D-Kulturansätze wurden die Zellen direkt in den 10 cm Kulturschalen lysiert. Das gewonnene Zelllysate wurde mit Qias shredder-Säulen durch Zentrifugation (13000 rpm, 2 min) homogenisiert und das Eluat mit 350 μl 70 %igem Ethanol versetzt. Anschließend wurde der komplette Ansatz in eine RNA Extraktionssäule pipettiert und nicht gebundene Bestandteile durch Zentrifugation (13000 rpm, 2 min) entfernt. Die an das Säulenmaterial gebundene Gesamt-RNA wurde 1x mit RW1 Waschpuffer (13000 rpm, 2 min) gereinigt und anschließend 2x mit 300 μl bzw. 500 μl RPE Puffer gewaschen (13000 rpm, 2 min). Die gereinigte RNA wurde schließlich in 30 μl RNase freiem H₂O eluiert.

6.2.4.1.2 RNA-Quantifizierung

Die Bestimmung von RNA-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers. RNA kann bei 260 nm photometrisch quantifiziert werden, wobei zugrunde gelegt wird, dass eine RNA-Lösung mit einer optischen Dichte (OD) von 1,0 eine Konzentration von 40 $\mu\text{g/mL}$ aufweist. Hierzu wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Nach

Verdünnung der Proben im Verhältnis von 1:20 mit RNase-freiem Wasser, wurde das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm bestimmt und die Nukleinsäurekonzentration durch das verwendete Programm nach folgender Formel berechnet: $\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml}$.

Zur Beurteilung des Reinheitsgrades wurde parallel die Absorption des Proteinanteils in der Probe gemessen (Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm). Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gilt als Maß für die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1.8 und 2.1 liegen.

6.2.4.1.3 Semiquantitative RT-PCR

Die relative Expression von Caveolin-1, DARPP-32 und β -Aktin mRNA wurde mit genspezifischen Primern (siehe 2.1.5) durch reverse Transkriptase PCR und Verwendung des LightCycler® Geräts (Roche) bestimmt. Für die RT-PCR Reaktionen wurden pro Ansatz gleiche Mengen Gesamt-RNA (300 ng) mit den Komponenten des RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche) in ein Glaskapillaren pipettiert. Für jede Reaktion wurden 7,5 μl Reaktionsmix (enthält reverse Transkriptase, DNA Polymerase, NTPs und SYBR Green I), 9,2 μl RNase freies Wasser, 1,3 μl $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ (Endkonzentration: 3,25 μM) und je 0,5 μl forward and reverse Primer (Endkonzentration je 0,5 μM) eingesetzt. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 5 sec) wurden die Glaskapillaren in den Rotor des LightCycler® Gerät eingesetzt und das Meßprogramm gestartet. Das optimierte Programm bestand aus einem RT Schritt (Synthese genspezifischer cDNA; 20 min, 61 °C) und einem PCR Schritt (DNA Amplifikation mit 40 PCR-Zyklen: 1. Denaturierung 95 °C, 2. Primer-Annealing 58 °C, 3. Elongation 72 °C).

Die Menge des synthetisierten PCR-Produkts wurde nach jedem PCR-Zyklus durch Messung der Fluoreszenzintensität (Einbau von SYBR Green I in doppelsträngige DNA) bei einer Temperatur von 76 bzw. 82 °C bestimmt und so der RT-PCR Verlauf aufgezeichnet (Realtime PCR). Der Abschluss des Programms bildete eine Schmelzpunktanalyse des Reaktionsprodukts durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung bei Temperaturerhöhung von 40 °C auf 99 °C. In jeder PCR wurde eine Negativkontrolle in Form einer H_2O -Probe mitgeführt, um Kontamination der Chemikalien mit DNA auszuschließen. Diese zeigten keine nullwertdifferenten Extinktionen. Alle Proben wurden im Doppelansatz gemessen. Aus den aufgezeichneten PCR-Kurven wurde mit Hilfe eines Auswertungsprogramms der relative Unterschied der mRNA Expression in verschiedenen Proben ermittelt. Dabei wurde für jede PCR-Kurve ein Schwellenwert bestimmt, der den Beginn der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion festlegt. Die Zyklenzahl, bei der die PCR-Kurve in die exponentielle Phase übergeht (Crossing Point = cp) gibt Auskunft über den relativen Expressionsunterschied der initial in

den Proben vorhandenen spezifischen mRNA Moleküle. Die Berechnung der Expressionsniveaus in % erfolgte nach folgender Formel: $\text{relative Expression} = 100/(2^{\Delta\text{cp}}) \%$.

6.2.4.2 Erstellen von Genexpressionsprofilen

Die total-RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, IVT (*in vitro* transcription) cRNA-Fragmentierung und die Hybridisierung auf dem Human Genome U133 Plus 2.0 Array der Firma Affymetrix wurde von Ute Bär im Labor von Helmut Burtscher anhand von Standardprotokollen (siehe Dissertation von Marion Hirt, 2005) durchgeführt. Die Auswahl der Sequenzen basiert auf der Datenbank Unigene, welche geclusterte Gen- und mRNA-Sequenzen enthält. Aus diesen leitet der Affymetrix-Algorithmus komplementäre Oligonukleotidsequenzen ab, die einerseits möglichst spezifisch für das jeweilige Transkript sind, andererseits möglichst nah am 3'-Ende liegen, damit auch bei vorzeitigem Kettenabbruch während der reversen Transkription noch eine verlässliche Detektion möglich ist. Der in allen beschriebenen Genexpressionsexperimenten verwendete Chiptyp HG-U133 Plus 2.0 repräsentiert 38500 annotierte Gene und ermöglicht die Detektion von ca. 47000 Transkripten.

Das Ziel der Auswertung war es, einerseits möglichst alle durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen differenziell exprimierten Gene zu erfassen, also die Zahl der falsch negativen Ergebnisse auf ein Minimum zu reduzieren, andererseits aber auch falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, indem nur verlässlich detektierte Signale und robuste Änderungen einbezogen werden. Die Datenauswertung erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, wie bei Hirt M., 2005 beschrieben. Die erhaltenen Datensätze wurden in einem mehrstufigen Prozess gefiltert, der im Folgenden kurz beschrieben wird:

- Filtern auf ausreichende Signalintensität und verlässliche Detektion: Aus Erfahrungswerten, die aus einer Vielzahl von Chipexperimenten stammen, ließ sich ableiten, dass Signale mit einem Intensitätswert < 100 häufig nicht mehr verlässlich detektiert werden. Diese Signale wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Außerdem steht mit dem Call ein weiterer Parameter zur Verfügung, der angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit das detektierte Signal tatsächlich auf der sequenzspezifischen Hybridisierung des gewünschten Transkripts beruht (qualitativer Parameter). Nur Signale mit einem present Call von $\geq 0,5$ wurden in die Auswertung aufgenommen.
- Filtern auf Homogenität der Replikate: In jedem Versuch wurden biologische Replikate (Triplikate) angefertigt. Um Signalartefakte zu vermeiden wurde zunächst jeder Chip einzeln mit dem Mittelwert des Signals aus den Triplikaten verglichen. Neben den Kriterien für Signal und Call wurde hierbei gefordert, dass in jedem dieser Einzelvergleiche eine

Veränderung der Signalthöhe entsprechend einem Änderungsfaktor von ≥ 1 bzw. ≤ -1 vorlag, also der Transkriptlevel auf das 2-fache angestiegen oder auf das 0,5fache reduziert war.

Beispiele zur Bedeutung des Änderungsfaktor:

+2 → Signal liegt beim Dreifachen des Kontrollwerts

+1 → Signal liegt beim Doppelten des Kontrollwerts

0 → Signal entspricht exakt dem Kontrollwert

-1 → Signal liegt bei der Hälfte des Kontrollwerts

-2 → Signal liegt beim Drittel des Kontrollwerts

6.2.4.3 Klonierung von pcDNA3-DARPP-32-Varianten

Die Klonierung der jeweiligen DARPP-32 Konstrukte erfolgte durch Ute Bär im Labor von Helmut Burtscher bei Roche Diagnostics in Penzberg. Als Matrize diente der DARPP-32 human cDNA-Klon (TC126726) von OriGene. Mittels PCR wurden verschiedene DARPP-32 Varianten amplifiziert. Die mutanten DARPP-Fragmente wurden mittels „site-directed“ Mutagenese über PCR generiert. Über eine Restriktionshydrolyse mit den Enzymen NheI und BamHI wurde ein Teil der ursprünglichen Polylinkersequenz aus dem *pcDNA3*-Vektor entfernt. Die DARPP-Fragmente wurden anschließend in den *pcDNA3*-Vektor ligiert.

Überblick über die verwendeten Konstrukte:

pcDNA3-leerVektor, *pcDNA3-DARPP-32*, *pcDNA3-t-DARPP*, *pcDNA3-DARPP-T34A*, *pcDNA3-DARPP-T75A*, *pcDNA3-DARPP-T34A-T75A*

Der *pcDNA3*-Vektor (Invitrogen) besitzt ein Resistenzgen für Neomycin, so dass eine Selektion der transfizierten Zellen mit G418 durchgeführt werden konnte.

6.2.4.4 Stabile Transfektion von Plasmiden mittels Lipofektion

Bei der Lipofektion interagieren kationische Lipide mit der DNA und bilden aufgrund der entgegengesetzten Ladungen stabile Komplexe, welche durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit FuGene6TM-Reagenz. Hierzu wurden 1×10^5 Zellen am Vortag der Transfektion in 6-Napfplatten ausgesät. Für die Transfektion von Zellen in einer Vertiefung einer 6-Napfplatte wurden 100 μ l eines Reaktionsmixes, bestehend aus 1 μ g Plasmid-DNA, 3 μ l FuGene6TM-Reagenz und 96 μ l Opti-MEM, angesetzt. In einem Reaktionsgefäß wurde das vorgewärmte Opti-MEM vorgelegt und FuGene6TM zupipettiert, ohne hierbei die Gefäßwand zu berühren. Nach kurzem Vortexen und einer Inkubationsdauer von 5 min bei RT, wurde die DNA zugegeben, nochmals kurz gevortext und für weitere 15

min inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben, die Platte leicht geschwenkt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Um stabile Transfektanten zu selektionieren wurde 48 h nach der Transfektion das Medium gewechselt und zum frischen Medium 0,7 mg/ml G418 hinzupipettiert. Von da ab wurden die Zellen immer in Gegenwart von 0,7 mg/ml G418 kultiviert.

6.2.5 Proteinchemische Methoden

6.2.5.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellkultur

Für die Herstellung von Zelllysaten zum Proteinnachweis wurden Spheroide aus einer 6-Napfplatte auf Eis vereinigt und zentrifugiert (950 rpm, 5 min, 4°C). Anschließend wurde das Zellsediment mit kaltem 1xPBS gewaschen, in ein Eppendorfgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Beim Nachweis von Phosphoproteinen wurden die Zellen vor der Zellernte zusätzlich für 6 min mit 2 mM Natrium-*ortho*-Vanadat bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in 150-200 µl Lysepuffer für Western Blot lysiert. Für die 2D-Kulturansätze wurden die Zellen auf Eis in kaltem 1xPBS gewaschen und direkt in der Kulturschale bzw. in den -platten, durch Zuhilfenahme eines Zellschabers, lysiert (250 µl Lysepuffer/10 cm Kulturschale, 80-100 µl Lysepuffer/Vertiefung einer 6-Napfplatte). Das 2D-Zelllysate wurde ebenfalls in ein Eppendorfgefäß überführt und schockgefroren. Die Zelllysate wurden während einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis mehrmals resuspendiert und anschließend die nicht solubilisierten Zellbestandteile durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C) abgetrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Es wurde darauf geachtet, die Proteinkonzentrationsbestimmung unmittelbar nach der Lyse durchzuführen.

6.2.5.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus humanen Tumorproben

Zur spezifischen Bestimmung der Tumorareale in frisch gefrorenen humanen Tumorresektaten wurden Gewebsschnitte mit Hämalaun/Eosin gefärbt und die Bereiche, die Tumorzellen enthielten mit einem wasserfesten Stift auf dem Objektträger markiert. Diese Schnitte wurden verwendet um auf den gefrorenen Resektaten die Tumorareale zu identifizieren und 40-60 mg Tumorgewebe abzuschneiden. Die Tumorstücke wurden bei der Aufarbeitung bereits gut zerkleinert und in 500 µl Lysepuffer für Tumorproben 1h bei 4°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Tumor-Lysepuffer-Gemisch mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze in ein bei -20°C vorgekühltes Reaktionsgefäß, das kleine Keramikkügelchen enthielt, überführt. Mit dem MagNA Lyser Gerät wurden die

Proben, im vorgekühlten Rotorblock, bei einer Geschwindigkeit von 6500 rpm für 30 sec bearbeitet und anschließend sofort ins Eisbad gestellt, um die Proben zu kühlen. Nach 2 min wurden die Proben erneut mit dem MagNA Lyser bearbeitet, 2 min im Eisbad gekühlt und für 10 min bei 14 000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, um eine Kontamination mit Gewebefett zu vermeiden, und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde sofort der Gesamtproteingehalt der Lysate bestimmt.

6.2.5.3 Gewinnung nukleärer Proteinextrakte

Nukleäre Proteine wurden unter Verwendung des Nuclear Extract Kit von Active Motif gewonnen. Nach Herstellerangaben wurden alle hierfür benötigten Schritte auf Eis durchgeführt. Spheroide wurden aus einer 6-Napfplatte auf Eis vereinigt und zentrifugiert (950 rpm, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden in 1 ml Phosphataseinhibitor Lösung (1:20 verdünnt in kaltem 1xPBS) gewaschen und in ein Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für den Zellen aus dem 2D-Ansatz wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen in 5 ml Phosphataseinhibitor Lösung (1:20 verdünnt in kaltem 1xPBS) gewaschen. Unerwünschte Proteinmodifikationen (Proteolyse, Dephosphorylierung, etc.) sollten durch diesen Schritt minimiert werden. Die Zellen aus dem 2D-Experiment wurden in 1 ml der Phosphataseinhibitor-Lsg. mit einem Plastischaber vorsichtig abgekratzt, resuspendiert und die Lösung in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde anschließend in 125 µl hypotonischer Lösung (1:10 in bidest Wasser verdünnt) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5,25 µl Detergenz zugegeben und 10 sec gevortext, um die Zellmembranen vollständig aufzubrechen. Im nachfolgenden Zentrifugationsschritt für 30 sec bei 14000 g und 4 °C konnten nun die im Überstand gelösten zytoplasmatischen Proteine von den pelletierten Zellkernen getrennt werden. Das Pellet wurde in 20 µl Lysepuffer mit 1 mM DTT (1:1000) und Protease Inhibitorcocktail (1:100) resuspendiert, 10 sec gevortext und 30 min auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Nach 30 sec Vortexen der Proben und 10 min Zentrifugation bei 14000 g und 4 °C konnten die nukleären Proteine im Überstand gewonnen werden. Der Überstand mit den gelösten zytoplasmatischen Proteinen wurde für die Bestimmung des Proteingehalts verwendet und basierend auf den Ergebnisse wurde die Normierung der Kernextrakte durchgeführt.

6.2.5.4 Proteinquantifizierung von Zellextrakten

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Zelllysate erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce. Dieser Test beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion) und der kolorimetrischen Detektion des violetten Farbkomplexes von Cu^{1+} und Bicinchoninsäure (BCA). Dieser Chelatkomplex aus zwei Molekülen BCA und einem Cu^{1+} -Ion zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, die linear mit steigender Proteinkonzentration zunimmt. Zur Quantifizierung wurden die zellulären Proteinextrakte in einer Vertiefung einer 96-Napfplatte 1:20 verdünnt. Parallel dazu wurde eine Konzentrationsreihe von 20-200 $\mu\text{g/ml}$ mit BSA (Bovine Serum Albumin, Rinder-Serumalbumin) hergestellt. Zur Herstellung des Micro-BCA™-Reagenzes wurden Reagenz A, B und C des Test- Kits im Verhältnis 25:24:1 angesetzt und jeweils 100 μL davon zur Proteinlösung pipettiert. Das Ganze wurde bei RT für 30 sec geschüttelt und anschließend für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Detektion erfolgte bei 562 nm und einer Referenzwellenlänge von 700 nm mit dem ELISA Plattenlesegerät Image Spectra Rainbow (Tecan). Die Proteinbestimmung erfolgte jeweils in Dublikaten.

Direkt im Anschluss an die Proteinbestimmung wurden die Zelllysate mit dem jeweiligen Lysepuffer normiert, mit 4xSDS Probenpuffer/2.5% β -Mercaptoethanol versetzt und bei 96°C für 5 min gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Proben aliquotiert und bei -20°C gelagert. Bevor die Proben für die Gelelektrophorese verwendet wurden, wurden sie erneut bei 96°C für 5 min aufgekocht.

6.2.5.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Western Blot Analyse

Proteine wurden mittels SDS-PAGE auf einem 4-12 %igen NUPAGE Bis-Tris Polyacrylamid- Gel aufgrund ihrer relativen Molekularmasse getrennt. Pro Geltasche wurden gleiche Proteinmengen (25 oder 30 μg) auf das Gel geladen und die Proteine bei einer konstanten Spannung von 180 V in MES-Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenstandard wurden jeweils 5 μl BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder mit aufs Gel aufgetragen. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit der „semi-dry blotting“-Methode auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurden das SDS Gel, zwei Lagen Whatman-Papier und eine auf Gelgröße abgestimmte Nitrocellulose-Membran in Semi-Dry Transferpuffer vorinkubiert. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer Semi-Dry-Blotapparatur der Firma Bio-Rad. Auf die Anode der Blotkammer wurden ein Filterpapier, die Nitrozellulose-Membran, das Gel und ein weiteres Filterpapier luftblasenfrei geschichtet. Danach wurde die Blot-Apparatur mit Kathode und Deckel verschlossen und der

Proteintransfer durch Anlegen einer konstanten Spannung von 18 V für 1 h durchgeführt. Anschließend wurde die Membran 2 min bei RT in Ponceau S Solution inkubiert, um die transferierten Proteinbanden sichtbar zu machen und um so den gleichmäßigen Transfer der Proteine überprüfen zu können.

Für die anschließende Immundetektion spezifischer Proteine wurde das Lumi-LightPLUS Western-Blotting Kit von Roche verwendet. Dazu wurde die Membran nach dem Blotten zunächst für 1 h in Blockierungslösung (1 % BSA) auf einem Schüttler blockiert und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (Verdünnung in Blockierungslösung) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen und für 2 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran mit Lumi-Light Substrat benetzt und das bei der Substratumsetzung auf der Membran emittierte Licht bei verschiedenen Expositionszeiten mit dem Lumi-Imager nachgewiesen.

6.2.5.6 Strippen von Membranen

Um gebundene Antikörper von der Nitrocellulose-Membran zu entfernen, wurde diese zunächst für 1 h in TBS unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran bei 60 °C für 30 min in Strip-Puffer (TBS mit 1 % SDS) und nachfolgendem erneuten Waschen in TBS für 1 h. Bevor die Membran erneut mit frischem Primärantikörper inkubiert werden konnte, wurde sie eine Stunde in Blockierungslösung (1 % BSA) inkubiert.

6.2.6 Biochemische und histologische Methoden

6.2.6.1 Auftrennung von Proteinkomplexen mittels linearen Sucrosegradienten

Für die Auftrennung im linearen Sucrosegradienten wurden Zellen aus 3D-Kultur ($3,6 \times 10^6$ Zellen → drei 6-Napfplatten mit je 200.000 Zellen/Napf) und 2D-Kultur ($3,6 \times 10^6$ Zellen → drei 15 cm Kulturplatten mit je $1,2 \times 10^6$ Zellen/Platte) geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Zelllyse wurde der Lysepuffer nach Scottocornola et al. verwendet, um die Ergebnisse mit denen der Publikation vergleichen zu können (Scottocornola et al, 2006). Während der einstündigen Lyse der Zellen in 600 µl Lysepuffer auf Eis wurden die Lysate mehrmals auf- und abpipettiert um eine homogene Lyse zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand abgenommen und das Zellsediment zwei Mal mit 500 µl Lysepuffer gewaschen, wobei jeweils zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen wurde. Das verbleibende Zellsediment wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 10 min bei

97°C gekocht, 30 sec gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Anschließend wurden 20 µl des homogenisierten Zellsediments auf das Proteingel aufgetragen.

Parallel dazu wurde für das Zelllysate der Proteingehalt bestimmt und die Lysate normiert.

Die normierten Lysate wurden vorsichtig luftblasenfrei auf den linearen Sucrosedichtegradienten (5-30%) pipettiert (Endvolumen 2 ml) und anschließend für 13 h bei 200.000xg bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden jeweils Fraktionen mit einem Volumen von 360 µl gesammelt, sofort mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 97°C gekocht. Auf das Proteingel wurden jeweils 25 µl der einzelnen Fraktionen aufgetragen.

6.2.6.2 Hämatoxylin- und Eosinfärbung von Gewebsschnitten

Die HE-Färbung der formalinfixierten Schnitte erfolgt nach Standardprotokollen in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Pathologie in der Abteilung von Susanne Arbogast. Bei der HE-Färbung werden die Zellkerne durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin blau bis violett und Cytoplasmabereiche mit dem sauren Xanthenfarbstoff Eosin rosa bis rot angefärbt. Dazu wurden entparaffinierte und rehydrierte Gewebeschnitte, mit einer Dicke von 1-2 µm, in spezielle Objektträgerständer einsortiert und in einer mit Hämalun nach Mayer-Lösung (pH 3) gefüllten Glasküvette für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min unter fließendem Leitungswasser „gebläut“, wobei Hämatoxylin durch Erhöhung des pH-Wertes seine charakteristische blaue Farbe ausbildet. Bevor und nachdem die Schnitte für die Zellplasmafärbung in 1 %iger Eosin-Lösung (ca. 1 min) eingelegt wurden, wurde nicht gebundener Farbstoff kurz in Aqua dest. ausgewaschen. Schließlich wurden die Gewebeschnitte in einer Alkoholreihe steigender Ethanolkonzentration dehydriert (70 % EtOH, 5 sec zur Differenzierung; 80 % und 90 % EtOH für je 30 sec, 2x 100 % EtOH für je 1 min und 2x Xylol für je 5 min), die Objektträger mit Eukitt Eindeckmedium beschichtet und zum Schluß mit Deckgläsern eingedeckt.

7 Literaturverzeichnis

Albini, A. and M.B.Sporn. 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* 7:139-147.

Alford, D. and J.Taylor-Papadimitriou. 1996. Cell adhesion molecules in the normal and cancerous mammary gland. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia*. 1:207-218.

Ali, S.M., W.P.Carney, F.J.Esteva, M.Fornier, L.Harris, W.J.Kostler, J.P.Lotz, D.Luftner, M.F.Pichon, and A.Lipton. 2008. Serum HER-2/neu and relative resistance to trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Cancer*.

Allen, J.A., R.A.Halverson-Tamboli, and M.M.Rasenick. 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:128-140.

Anido, J., M.Scaltriti, J.J.Bech Serra, J.B.Santiago, F.R.Todo, J.Baselga, and J.Arribas. 2006. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J.* 25:3234-3244.

Arnould, L., M.Gelly, F.Penault-Llorca, L.Benoit, F.Bonnetain, C.Migeon, V.Cabaret, V.Fermeaux, P.Bertheau, J.Garnier, J.F.Jeannin, and B.Coudert. 2006. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br. J. Cancer* 94:259-267.

Barros, E.J., O.F.Santos, K.Matsumoto, T.Nakamura, and S.K.Nigam. 1995. Differential tubulogenic and branching morphogenetic activities of growth factors: implications for epithelial tissue development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:4412-4416.

Baselga, J., D.Tripathy, J.Mendelsohn, S.Baughman, C.C.Benz, L.Dantis, N.T.Sklar, A.D.Seidman, C.A.Hudis, J.Moore, P.P.Rosen, T.Twaddell, I.C.Henderson, and L.Norton. 1996. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 14:737-744.

Beckler, A., C.A.Moskaluk, A.Zaika, G.M.Hampton, S.M.Powell, H.F.Frierson, Jr., and W.El-Rifai. 2003. Overexpression of the 32-kilodalton dopamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein in common adenocarcinomas. *Cancer* 98:1547-1551.

Beerli, R.R., D.Graus-Porta, K.Woods-Cook, X.Chen, Y.Yarden, and N.E.Hynes. 1995. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol. Cell Biol.* 15:6496-6505.

Belkhiri, A., A.A.Dar, A.Zaika, M.Kelley, and W.El-Rifai. 2008. t-Darpp promotes cancer cell survival by up-regulation of Bcl2 through Akt-dependent mechanism. *Cancer Res.* 68:395-403.

Belkhiri, A., A.Zaika, N.Pidkovka, S.Knuutila, C.Moskaluk, and W.El-Rifai. 2005. Darpp-32: a novel antiapoptotic gene in upper gastrointestinal carcinomas. *Cancer Res.* 65:6583-6592.

- Ben-Levy, R., H.F.Paterson, C.J.Marshall, and Y.Yarden. 1994. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *EMBO J.* 13:3302-3311.
- Berns, K., H.M.Horlings, B.T.Hennessy, M.Madiredjo, E.M.Hijmans, K.Beelen, S.C.Linn, A.M.Gonzalez-Angulo, K.Stemke-Hale, M.Hauptmann, R.L.Beijersbergen, G.B.Mills, d.van, V, and R.Bernards. 2007. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12:395-402.
- Bhowmick, N.A., E.G.Neilson, and H.L.Moses. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432:332-337.
- Bibb, J.A., G.L.Snyder, A.Nishi, Z.Yan, L.Meijer, A.A.Fienberg, L.H.Tsai, Y.T.Kwon, J.A.Girault, A.J.Czernik, R.L.Huganir, H.C.Hemmings, Jr., A.C.Nairn, and P.Greengard. 1999. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 402:669-671.
- Blume-Jensen, P. and T.Hunter. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365.
- Bokoch, G.M. 2003. Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 72:743-781.
- Bouchard, L., L.Lamarre, P.J.Tremblay, and P.Jolicoeur. 1989. Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* 57:931-936.
- Brafford, P. and M.Herlyn. 2005. Gene expression profiling of melanoma cells - searching the haystack. *J. Transl. Med.* 3:2.
- Brandt, R., A.M.Wong, and N.E.Hynes. 2001. Mammary glands reconstituted with Neu/ErbB2 transformed HC11 cells provide a novel orthotopic tumor model for testing anti-cancer agents. *Oncogene* 20:5459-5465.
- Brown, D.A. and E.London. 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* 164:103-114.
- Burgermeister, E., M.Liscovitch, C.Rocken, R.M.Schmid, and M.P.Ebert. 2008. Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett.* 268:187-201.
- Carlsson, J. 1977. A proliferation gradient in three-dimensional colonies of cultured human glioma cells. *Int. J. Cancer* 20:129-136.
- Carraway, K.L., III and L.C.Cantley. 1994. A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 78:5-8.
- Carraway, K.L., III, S.P.Soltoff, A.J.Diamonti, and L.C.Cantley. 1995. Heregulin stimulates mitogenesis and phosphatidylinositol 3-kinase in mouse fibroblasts transfected with erbB2/neu and erbB3. *J. Biol. Chem.* 270:7111-7116.
- Carter, P., L.Presta, C.M.Gorman, J.B.Ridgway, D.Henner, W.L.Wong, A.M.Rowland, C.Kotts, M.E.Carver, and H.M.Shepard. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:4285-4289.
- Carter, P.J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.* 6:343-357.

Chambers, A.F., A.C.Groom, and I.C.MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2:563-572.

Cho, H.S., K.Mason, K.X.Ramyar, A.M.Stanley, S.B.Gabelli, D.W.Denney, Jr., and D.J.Leahy. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421:756-760.

Christianson, T.A., J.K.Doherty, Y.J.Lin, E.E.Ramsey, R.Holmes, E.J.Keenan, and G.M.Clinton. 1998. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res.* 58:5123-5129.

Clynes, R.A., T.L.Towers, L.G.Presta, and J.V.Ravetch. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6:443-446.

Cobleigh, M.A., C.L.Vogel, D.Tripathy, N.J.Robert, S.Scholl, L.Fehrenbacher, J.M.Wolter, V.Paton, S.Shak, G.Lieberman, and D.J.Slamon. 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* 17:2639-2648.

Condeelis, J. and J.W.Pollard. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-266.

Couch, D.B. 1996. Carcinogenesis: basic principles. *Drug Chem. Toxicol.* 19:133-148.

Couet, J., M.Sargiacomo, and M.P.Lisanti. 1997. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J. Biol. Chem.* 272:30429-30438.

Coussens, L., T.L.Yang-Feng, Y.C.Liao, E.Chen, A.Gray, J.McGrath, P.H.Seeburg, T.A.Libermann, J.Schlessinger, U.Francke, and . 1985. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230:1132-1139.

Croce, C.M. 2008. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* 358:502-511.

Cuello, M., S.A.Ettenberg, A.S.Clark, M.M.Keane, R.H.Posner, M.M.Nau, P.A.Dennis, and S.Lipkowitz. 2001. Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res.* 61:4892-4900.

Dankort, D., N.Jeyabalan, N.Jones, D.J.Dumont, and W.J.Muller. 2001. Multiple ErbB-2/Neu Phosphorylation Sites Mediate Transformation through Distinct Effector Proteins. *J. Biol. Chem.* 276:38921-38928.

Dans, M., L.Gagnoux-Palacios, P.Blaikie, S.Klein, A.Mariotti, and F.G.Giancotti. 2001. Tyrosine phosphorylation of the beta 4 integrin cytoplasmic domain mediates Shc signaling to extracellular signal-regulated kinase and antagonizes formation of hemidesmosomes. *J. Biol. Chem.* 276:1494-1502.

- Debnath, J. and J.S.Brugge. 2005. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat. Rev. Cancer* 5:675-688.
- Debnath, J., K.R.Mills, N.L.Collins, M.J.Reginato, S.K.Muthuswamy, and J.S.Brugge. 2002. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* 111:29-40.
- Del Pozo, M.A., L.S.Price, N.B.Alderson, X.D.Ren, and M.A.Schwartz. 2000. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J.* 19:2008-2014.
- DeMars, R. and K.R.Held. 1972. The spontaneous azaguanine-resistant mutants of diploid human fibroblasts. *Humangenetik.* 16:87-110.
- DiAugustine, R.P., R.G.Richards, and J.Sebastian. 1997. EGF-related peptides and their receptors in mammary gland development. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 2:109-117.
- Downward, J., P.Parker, and M.D.Waterfield. 1984. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 311:483-485.
- Dubska, L., L.Andera, and M.A.Sheard. 2005. HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 579:4149-4158.
- Ebihara, Y., M.Miyamoto, A.Fukunaga, K.Kato, T.Shichinohe, Y.Kawarada, T.Kurokawa, Y.Cho, S.Murakami, H.Uehara, H.Kaneko, H.Hashimoto, Y.Murakami, T.Itoh, S.Okushiba, S.Kondo, and H.Katoh. 2004. DARPP-32 expression arises after a phase of dysplasia in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 91:119-123.
- El-Rifai, W., M.F.Smith, Jr., G.Li, A.Beckler, V.S.Carl, E.Montgomery, S.Knuutila, C.A.Moskaluk, H.F.Frierson, Jr., and S.M.Powell. 2002. Gastric cancers overexpress DARPP-32 and a novel isoform, t-DARPP. *Cancer Res.* 62:4061-4064.
- Elenbaas, B. and R.A.Weinberg. 2001. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* 264:169-184.
- Engelman, J.A., C.Chu, A.Lin, H.Jo, T.Ikezu, T.Okamoto, D.S.Kohtz, and M.P.Lisanti. 1998a. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett.* 428:205-211.
- Engelman, J.A., R.J.Lee, A.Karnezis, D.J.Bearss, M.Webster, P.Siegel, W.J.Muller, J.J.Windle, R.G.Pestell, and M.P.Lisanti. 1998b. Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer. *J. Biol. Chem.* 273:20448-20455.
- Engelman, J.A., C.C.Wykoff, S.Yasuhara, K.S.Song, T.Okamoto, and M.P.Lisanti. 1997. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem.* 272:16374-16381.

- Engelman, J.A., K.Zejnullahu, T.Mitsudomi, Y.Song, C.Hyland, J.O.Park, N.Lindeman, C.M.Gale, X.Zhao, J.Christensen, T.Kosaka, A.J.Holmes, A.M.Rogers, F.Cappuzzo, T.Mok, C.Lee, B.E.Johnson, L.C.Cantley, and P.A.Janne. 2007. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316:1039-1043.
- Esteva, F.J., V.Valero, D.Booser, L.T.Guerra, J.L.Murray, L.Pusztai, M.Cristofanilli, B.Arun, B.Esmaeli, H.A.Fritsche, N.Sneige, T.L.Smith, and G.N.Hortobagyi. 2002. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 20:1800-1808.
- Falcioni, R., A.Antonini, P.Nistico, S.S.Di, M.Crescenzi, P.G.Natali, and A.Sacchi. 1997. Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp. Cell Res.* 236:76-85.
- Ferrara, N. and R.S.Kerbel. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438:967-974.
- Fiucci, G., D.Ravid, R.Reich, and M.Liscovitch. 2002. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 21:2365-2375.
- Folkman, J. 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* 82:4-6.
- Friedland, J.C., J.N.Lakins, M.G.Kazanietz, J.Chernoff, D.Boettiger, and V.M.Weaver. 2007. {alpha}6beta4 integrin activates Rac-dependent p21-activated kinase 1 to drive NF- κ B-dependent resistance to apoptosis in 3D mammary acini. *J. Cell Sci.* 120:3700-3712.
- Gennari, R., S.Menard, F.Fagnoni, L.Ponchio, M.Scelsi, E.Tagliabue, F.Castiglioni, L.Villani, C.Magalotti, N.Gibelli, B.Oliviero, B.Ballardini, P.G.Da, A.Zambelli, and A.Costa. 2004. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin. Cancer Res.* 10:5650-5655.
- Ghosh, S., G.C.Spagnoli, I.Martin, S.Ploegert, P.Demougin, M.Heberer, and A.Reschner. 2005. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *J. Cell Physiol* 204:522-531.
- Gianni L, Eiermann W, Pusztai L, Semiglazov V, Hoegel B, Koehler A, Manikhas GM, Bates M, Valagussa P, Baselga J. 2008. Biomarkers as potential predictors of pathologic complete response in the NOAH trial of neoadjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer. ASCO oral presentation.
- Gimbrone, M.A., Jr., S.B.Leapman, R.S.Cotran, and J.Folkman. 1972. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* 136:261-276.
- Ginestier, C., J.Adelaide, A.Goncalves, L.Repellini, F.Sircoulomb, A.Letessier, P.Finetti, J.Geneix, E.Charafe-Jauffret, F.Bertucci, J.Jacquemier, P.Viens, and D.Birnbaum. 2007. ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene*.
- Goetz, J.G., P.Lajoie, S.M.Wiseman, and I.R.Nabi. 2008. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev.* 27:715-735.

Gravalos, C. and A.Jimeno. 2008. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann. Oncol.*

Greengard, P. 2001. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294:1024-1030.
Guo, W. and F.G.Giancotti. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:816-826.

Guo, W., Y.Pylayeva, A.Pepe, T.Yoshioka, W.J.Muller, G.Inghirami, and F.G.Giancotti. 2006. Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 126:489-502.

Haibe-Kains, B., C.Desmedt, C.Sotiriou, and G.Bontempi. 2008. A comparative study of survival models for breast cancer prognostication based on microarray data: does a single gene beat them all? *Bioinformatics.*

Hamilton, G. 1998. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett.* 131:29-34.

Hanahan, D. and R.A.Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

Hansen, C., P.Greengard, A.C.Nairn, T.Andersson, and W.F.Vogel. 2006. Phosphorylation of DARPP-32 regulates breast cancer cell migration downstream of the receptor tyrosine kinase DDR1. *Exp. Cell Res.* 312:4011-4018.

Harder, T. and K.Simons. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:534-542.

Heldin, C.H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223.

Hemmings, H.C., Jr., P.Greengard, H.Y.Tung, and P.Cohen. 1984. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310:503-505.

Hirt Marion. 2005. Untersuchungen zur differentiellen Genexpression von humanen Tumor- und Normalzellen nach Behandlung mit antitumoralen Agenzien. Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Helmut Burtscher bei der Firma Roche Diagnostics GmbH.

Hsieh, A.C. and M.M.Moasser. 2007. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br. J. Cancer* 97:453-457.

Hubbard, S.R., M.Mohammadi, and J.Schlessinger. 1998. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 273:11987-11990.

Hudziak, R.M., G.D.Lewis, M.Winget, B.M.Fendly, H.M.Shepard, and A.Ullrich. 1989. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol. Cell Biol.* 9:1165-1172.

Hynes, N.E. and H.A.Lane. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 5:341-354.

- Ingber, D.E. 2006. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *Int. J. Dev. Biol.* 50:255-266.
- Isakoff, S.J., J.A.Engelman, H.Y.Irie, J.Luo, S.M.Brachmann, R.V.Pearline, L.C.Cantley, and J.S.Brugge. 2005. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 65:10992-11000.
- Ivascu, A. and M.Kubies. 2006. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J. Biomol. Screen.* 11:922-932.
- Izumi, Y., L.Xu, T.E.di, D.Fukumura, and R.K.Jain. 2002. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 416:279-280.
- Jacobson, M.D., M.Weil, and M.C.Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.
- Johnson, S.M., H.Grosshans, J.Shingara, M.Byrom, R.Jarvis, A.Cheng, E.Labourier, K.L.Reinert, D.Brown, and F.J.Slack. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-647.
- Johnson a RLWR. In: Alberts B, ed. Molekularbiologie der Zelle, 4 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. p. 1237-306.
- Johnston, S.R. and A.Leary. 2006. Lapatinib: a novel EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor for cancer. *Drugs Today (Barc.)* 42:441-453.
- Jones, F.E., D.J.Jerry, B.C.Guarino, G.C.Andrews, and D.F.Stern. 1996. Heregulin induces in vivo proliferation and differentiation of mammary epithelium into secretory lobuloalveoli. *Cell Growth Differ.* 7:1031-1038.
- Joyce, J.A. 2005. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 7:513-520.
- Jung, J.H. and J.A.Traugh. 2005. Regulation of the interaction of Pak2 with Cdc42 via autophosphorylation of serine 141. *J. Biol. Chem.* 280:40025-40031.
- Kallioniemi, O.P., A.Kallioniemi, W.Kurusu, A.Thor, L.C.Chen, H.S.Smith, F.M.Waldman, D.Pinkel, and J.W.Gray. 1992. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:5321-5325.
- Kalluri, R. and M.Zeisberg. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6:392-401.
- Karunagaran, D., E.Tzahar, R.R.Beerli, X.Chen, D.Graus-Porta, B.J.Ratzkin, R.Seger, N.E.Hynes, and Y.Yarden. 1996. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 15:254-264.
- Kauraniemi, P., M.Barlund, O.Monni, and A.Kallioniemi. 2001. New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res.* 61:8235-8240.

- Kauraniemi, P. and A.Kallioniemi. 2006. Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocr. Relat Cancer* 13:39-49.
- Kauraniemi, P., T.Kuukasjarvi, G.Sauter, and A.Kallioniemi. 2003. Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 163:1979-1984.
- Kim, H.H., S.L.Sierke, and J.G.Koland. 1994. Epidermal growth factor-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with the erbB3 gene product. *J. Biol. Chem.* 269:24747-24755.
- Kim, J.B. 2005. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* 15:365-377.
- Klapper, L.N., S.Glathe, N.Vaisman, N.E.Hynes, G.C.Andrews, M.Sela, and Y.Yarden. 1999. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:4995-5000.
- Kunz-Schughart, L.A. and R.Knuechel. 2002. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol. Histopathol.* 17:599-621.
- Kwon, T., D.Y.Kwon, J.Chun, J.H.Kim, and S.S.Kang. 2000. Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J. Biol. Chem.* 275:423-428.
- Kwon, Y.K., A.Bhattacharyya, J.A.Alberta, W.V.Giannobile, K.Cheon, C.D.Stiles, and S.L.Pomeroy. 1997. Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. *J. Neurosci.* 17:8293-8299.
- Lane, H.A., I.Beuvink, A.B.Motoyama, J.M.Daly, R.M.Neve, and N.E.Hynes. 2000. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol. Cell Biol.* 20:3210-3223.
- Lavie, Y., G.Fiucci, and M.Liscovitch. 1998. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biol. Chem.* 273:32380-32383.
- Lee, G.Y., P.A.Kenny, E.H.Lee, and M.J.Bissell. 2007. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat. Methods* 4:359-365.
- Lee, J., M.J.Cuddihy, and N.A.Kotov. 2008. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev.* 14:61-86.
- Lee, K.F., H.Simon, H.Chen, B.Bates, M.C.Hung, and C.Hauser. 1995. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378:394-398.
- Lee, S.W., C.L.Reimer, P.Oh, D.B.Campbell, and J.E.Schnitzer. 1998. Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 16:1391-1397.

- Lin, S.Y., K.Makino, W.Xia, A.Matin, Y.Wen, K.Y.Kwong, L.Bourguignon, and M.C.Hung. 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* 3:802-808.
- Liotta, L.A. and E.C.Kohn. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411:375-379.
- Liu, E., A.Thor, M.He, M.Barcos, B.M.Ljung, and C.Benz. 1992. The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene* 7:1027-1032.
- Liu, P.C., X.Liu, Y.Li, M.Covington, R.Wynn, R.Huber, M.Hillman, G.Yang, D.Ellis, C.Marando, K.Katiyar, J.Bradley, K.Abremski, M.Stow, M.Rupar, J.Zhuo, Y.L.Li, Q.Lin, D.Burns, M.Xu, C.Zhang, D.Q.Qian, C.He, V.Sharief, L.Weng, C.Agrios, E.Shi, B.Metcalf, R.Newton, S.Friedman, W.Yao, P.Scherle, G.Hollis, and T.C.Burn. 2006. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 5:657-664.
- Locascio, A. and M.A.Nieto. 2001. Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:464-469.
- Longva, K.E., N.M.Pedersen, C.Haslekas, E.Stang, and I.H.Madshus. 2005. Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. *Int. J. Cancer* 116:359-367.
- Lu, J., G.Getz, E.A.Miska, E.varez-Saavedra, J.Lamb, D.Peck, A.Sweet-Cordero, B.L.Ebert, R.H.Mak, A.A.Ferrando, J.R.Downing, T.Jacks, H.R.Horvitz, and T.R.Golub. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838.
- Lu, W., S.Katz, R.Gupta, and B.J.Mayer. 1997. Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Curr. Biol.* 7:85-94.
- Lu, Y., X.Zi, Y.Zhao, D.Mascarenhas, and M.Pollak. 2001. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J. Natl. Cancer Inst.* 93:1852-1857.
- MacDonald, I.C., A.C.Groom, and A.F.Chambers. 2002. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays* 24:885-893.
- Maqani, N., A.Belkhiri, C.Moskaluk, S.Knuutila, A.A.Dar, and W.El-Rifai. 2006. Molecular dissection of 17q12 amplicon in upper gastrointestinal adenocarcinomas. *Mol. Cancer Res.* 4:449-455.
- Mariotti, A., P.A.Kedeshian, M.Dans, A.M.Curatola, L.Gagnoux-Palacios, and F.G.Giancotti. 2001. EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin $\alpha 6 \beta 4$ at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J. Cell Biol.* 155:447-458.
- Marmor, M.D., K.B.Skaria, and Y.Yarden. 2004. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58:903-913.

- Mercurio, A.M. and I.Rabinovitz. 2001. Towards a mechanistic understanding of tumor invasion--lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Semin. Cancer Biol.* 11:129-141.
- Mimura, K., K.Kono, M.Hanawa, F.Mitsui, H.Sugai, N.Miyagawa, A.Ooi, and H.Fujii. 2005. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 92:1253-1260.
- Mineo, C., G.N.Gill, and R.G.Anderson. 1999. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J. Biol. Chem.* 274:30636-30643.
- Moasser, M.M. 2007. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26:6469-6487.
- Mocanu, M.M., Z.Fazekas, M.Petras, P.Nagy, Z.Sebestyen, J.Isola, J.Timar, J.W.Park, G.Vereb, and J.Szollosi. 2005. Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer Lett.* 227:201-212.
- Molina, M.A., J.Codony-Servat, J.Albanell, F.Rojo, J.Arribas, and J.Baselga. 2001a. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* 61:4744-4749.
- Molina, M.A., R.Saez, E.E.Ramsey, M.J.Garcia-Barchino, F.Rojo, A.J.Evans, J.Albanell, E.J.Keenan, A.Lluch, J.Garcia-Conde, J.Baselga, and G.M.Clinton. 2002. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 8:347-353.
- Morrison, C., V.Zanagnolo, N.Ramirez, D.E.Cohn, N.Kelbick, L.Copeland, G.L.Maxwell, and J.M.Fowler. 2006. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J. Clin. Oncol.* 24:2376-2385.
- Mueller-Klieser, W. 2000. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 36:123-139.
- Musolino, A., N.Naldi, B.Bortesi, D.Pezzuolo, M.Capelletti, G.Missale, D.Laccabue, A.Zerbini, R.Camisa, G.Bisagni, T.M.Neri, and A.Ardizzoni. 2008. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26:1789-1796.
- Muthuswamy, S.K., D.Li, S.Lelievre, M.J.Bissell, and J.S.Brugge. 2001. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat. Cell Biol.* 3:785-792.
- Nagata, Y., K.H.Lan, X.Zhou, M.Tan, F.J.Esteva, A.A.Sahin, K.S.Klos, P.Li, B.P.Monica, N.T.Nguyen, G.N.Hortobagyi, M.C.Hung, and D.Yu. 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6:117-127.
- Nagy, P., E.Friedlander, M.Tanner, A.I.Kapanen, K.L.Carraway, J.Isola, and T.M.Jovin. 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* 65:473-482.

- Nagy, P., A.Jenei, A.K.Kirsch, J.Szollosi, S.Damjanovich, and T.M.Jovin. 1999. Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 11):1733-1741.
- Nagy, P., G.Vereb, Z.Sebestyen, G.Horvath, S.J.Lockett, S.Damjanovich, J.W.Park, T.M.Jovin, and J.Szollosi. 2002. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J. Cell Sci.* 115:4251-4262.
- Nahta, R. and F.J.Esteva. 2003. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin. Cancer Res.* 9:5078-5084.
- Nahta, R. and F.J.Esteva. 2006. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res.* 8:215.
- Nahta, R. and F.J.Esteva. 2007. Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene* 26:3637-3643.
- Nahta, R., L.X.Yuan, Y.Du, and F.J.Esteva. 2007. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol. Cancer Ther.* 6:667-674.
- Nahta, R., L.X.Yuan, B.Zhang, R.Kobayashi, and F.J.Esteva. 2005. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* 65:11118-11128.
- Nelson, C.M. and M.J.Bissell. 2005. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin. Cancer Biol.* 15:342-352.
- O'Hare, M.J., J.Bond, C.Clarke, Y.Takeuchi, A.J.Atherton, C.Berry, J.Moody, A.R.Silver, D.C.Davies, A.E.Alsop, A.M.Neville, and P.S.Jat. 2001. Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:646-651.
- Ohmori, T., J.L.Yang, J.O.Price, and C.L.Arteaga. 1998. Blockade of tumor cell transforming growth factor-betas enhances cell cycle progression and sensitizes human breast carcinoma cells to cytotoxic chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 245:350-359.
- Park, K., S.Han, H.J.Kim, J.Kim, and E.Shin. 2006. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 48:702-707.
- Park, S.S., J.E.Kim, Y.A.Kim, Y.C.Kim, and S.W.Kim. 2005. Caveolin-1 is down-regulated and inversely correlated with HER2 and EGFR expression status in invasive ductal carcinoma of the breast. *Histopathology* 47:625-630.
- Parton, R.G. 1994. Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J. Histochem. Cytochem.* 42:155-166.

- Perou, C.M., T.Sorlie, M.B.Eisen, R.M.van de, S.S.Jeffrey, C.A.Rees, J.R.Pollack, D.T.Ross, H.Johnsen, L.A.Akslen, O.Fluge, A.Pergamenschikov, C.Williams, S.X.Zhu, P.E.Lonning, A.L.Borresen-Dale, P.O.Brown, and D.Botstein. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752.
- Podar, K., Y.T.Tai, C.E.Cole, T.Hideshima, M.Sattler, A.Hamblin, N.Mitsiades, R.L.Schlossman, F.E.Davies, G.J.Morgan, N.C.Munshi, D.Chauhan, and K.C.Anderson. 2003. Essential role of caveolae in interleukin-6- and insulin-like growth factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.* 278:5794-5801.
- Prenzel, N., O.M.Fischer, S.Streit, S.Hart, and A.Ullrich. 2001. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat Cancer* 8:11-31.
- Price-Schiavi, S.A., S.Jepson, P.Li, M.Arango, P.S.Rudland, L.Yee, and K.L.Carraway. 2002. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int. J. Cancer* 99:783-791.
- Quirke, P., A.Pickles, N.L.Tuzi, O.Mohamdee, and W.J.Gullick. 1989. Pattern of expression of c-erbB-2 oncoprotein in human fetuses. *Br. J. Cancer* 60:64-69.
- Radin, N.S., J.A.Shayman, and J.Inokuchi. 1993. Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances. *Adv. Lipid Res.* 26:183-213.
- Rankin, E.B. and A.J.Giaccia. 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death. Differ.* 15:678-685.
- Ravid, D., S.Maor, H.Werner, and M.Liscovitch. 2006. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv. Enzyme Regul.* 46:163-175.
- Razani, B., J.A.Engelman, X.B.Wang, W.Schubert, X.L.Zhang, C.B.Marks, F.Macaluso, R.G.Russell, M.Li, R.G.Pestell, V.D.Di, H.Hou, Jr., B.Kneitz, G.Lagaud, G.J.Christ, W.Edelmann, and M.P.Lisanti. 2001a. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276:38121-38138.
- Razani, B. and M.P.Lisanti. 2001a. Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships. *Exp. Cell Res.* 271:36-44.
- Razani, B., A.Schlegel, J.Liu, and M.P.Lisanti. 2001b. Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem. Soc. Trans.* 29:494-499.
- Reis, H.J., D.V.Rosa, M.M.Guimaraes, B.R.Souza, A.G.Barros, F.J.Pimenta, R.P.Souza, K.C.Torres, and M.A.Romano-Silva. 2007. Is DARPP-32 a potential therapeutic target? *Expert. Opin. Ther. Targets.* 11:1649-1661.
- Ritter, C.A., M.Perez-Torres, C.Rinehart, M.Guix, T.Dugger, J.A.Engelman, and C.L.Arteaga. 2007. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin. Cancer Res.* 13:4909-4919.

- Saal, L.H., K.Holm, M.Maurer, L.Memero, T.Su, X.Wang, J.S.Yu, P.O.Malmstrom, M.Mansukhani, J.Enoksson, H.Hibshoosh, A.Borg, and R.Parsons. 2005. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 65:2554-2559.
- Saez, R., M.A.Molina, E.E.Ramsey, F.Rojo, E.J.Keenan, J.Albanell, A.Lluch, J.Garcia-Conde, J.Baselga, and G.M.Clinton. 2006. p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 12:424-431.
- Sagara, Y., K.Mimori, K.Yoshinaga, F.Tanaka, K.Nishida, S.Ohno, H.Inoue, and M.Mori. 2004. Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 91:959-965.
- Saito, N., T.Okada, H.Horiuchi, N.Murakami, J.Takahashi, M.Nawata, H.Ota, K.Nozaaki, and K.Takaoka. 2001. A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat. Biotechnol.* 19:332-335.
- Schechter, A.L., D.F.Stern, L.Vaidyanathan, S.J.Decker, J.A.Drebin, M.I.Greene, and R.A.Weinberg. 1984. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312:513-516.
- Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225.
- Semenza, G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3:721-732.
- Sergina, N.V., M.Rausch, D.Wang, J.Blair, B.Hann, K.M.Shokat, and M.M.Moasser. 2007. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445:437-441.
- Sherr, C.J. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* 116:235-246.
- Shih, C., L.C.Padhy, M.Murray, and R.A.Weinberg. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290:261-264.
- Shweiki, D., M.Neeman, A.Itin, and E.Keshet. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:768-772.
- Simons, K. and E.Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Simons, K. and D.Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31-39.
- Slamon, D.J., G.M.Clark, S.G.Wong, W.J.Levin, A.Ullrich, and W.L.McGuire. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182.
- Slamon, D.J., W.Godolphin, L.A.Jones, J.A.Holt, S.G.Wong, D.E.Keith, W.J.Levin, S.G.Stuart, J.Udove, A.Ullrich, and . 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712.

- Slamon, D.J., B.Leyland-Jones, S.Shak, H.Fuchs, V.Paton, A.Bajamonde, T.Fleming, W.Eiermann, J.Wolter, M.Pegram, J.Baselga, and L.Norton. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344:783-792.
- Sliwkowski, M.X., J.A.Lofgren, G.D.Lewis, T.E.Hotaling, B.M.Fendly, and J.A.Fox. 1999. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.* 26:60-70.
- Soltoff, S.P. and L.C.Cantley. 1996. p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J. Biol. Chem.* 271:563-567.
- Soltoff, S.P., K.L.Carraway, III, S.A.Prigent, W.G.Gullick, and L.C.Cantley. 1994. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* 14:3550-3558.
- Sorlie, T., C.M.Perou, R.Tibshirani, T.Aas, S.Geisler, H.Johnsen, T.Hastie, M.B.Eisen, R.M.van de, S.S.Jeffrey, T.Thorsen, H.Quist, J.C.Matase, P.O.Brown, D.Botstein, L.P.Eystein, and A.L.Borresen-Dale. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:10869-10874.
- Sottocornola, E., B.Berra, and I.Colombo. 2003. GM3 content modulates the EGF-activated p185c-neu levels, but not those of the constitutively activated oncoprotein p185neu. *Biochim. Biophys. Acta* 1635:55-66.
- Sottocornola, E., R.Misasi, V.Mattei, L.Ciarlo, R.Gradini, T.Garofalo, B.Berra, I.Colombo, and M.Sorice. 2006. Role of gangliosides in the association of ErbB2 with lipid rafts in mammary epithelial HC11 cells. *FEBS J.* 273:1821-1830.
- Spector, N.L., W.Xia, H.Burris, III, H.Hurwitz, E.C.Dees, A.Dowlati, B.O'Neil, B.Overmoyer, P.K.Marcom, K.L.Blackwell, D.A.Smith, K.M.Koch, A.Stead, S.Mangum, M.J.Ellis, L.Liu, A.K.Man, T.M.Bremer, J.Harris, and S.Bacus. 2005. Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 23:2502-2512.
- Sutherland, R.M. 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240:177-184.
- Sutherland, R.M., H.A.Eddy, B.Bareham, K.Reich, and D.Vanantwerp. 1979. Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5:1225-1230.
- Sutherland, R.M., W.R.Inch, J.A.McCredie, and J.Kruuv. 1970. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med.* 18:491-495.
- Suzuki, E. and M.Toi. 2007. Improving the efficacy of trastuzumab in breast cancer. *Cancer Sci.* 98:767-771.

- Svenningsson, P., A.Nishi, G.Fisone, J.A.Girault, A.C.Nairn, and P.Greengard. 2004. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:269-296.
- Symons, M. 2000. Adhesion signaling: PAK meets Rac on solid ground. *Curr. Biol.* 10:R535-R537.
- Tan, W., R.Krishnaraj, and T.A.Desai. 2001. Evaluation of nanostructured composite collagen--chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng* 7:203-210.
- Tang, J.S., C.F.Chao, and M.K.Au. 1994. Growth and metabolism of cultured bone cells using microcarrier and monolayer techniques. *Clin. Orthop. Relat Res.* 254-258.
- Timms, J.F., S.L.White, M.J.O'Hare, and M.D.Waterfield. 2002. Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene* 21:6573-6586.
- Trusolino, L., A.Bertotti, and P.M.Comoglio. 2001. A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107:643-654.
- Valentinis, B., K.Reiss, and R.Baserga. 1998. Insulin-like growth factor-I-mediated survival from anoikis: role of cell aggregation and focal adhesion kinase. *J. Cell Physiol* 176:648-657.
- van de, W.M., N.Barker, I.C.Harkes, H.M.van der, N.J.Dijk, A.Hollestelle, J.G.Klijn, H.Clevers, and M.Schutte. 2001. Mutant E-cadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. *Cancer Res.* 61:278-284.
- van, d., V, Y.D.He, L.J.van't Veer, H.Dai, A.A.Hart, D.W.Voskuil, G.J.Schreiber, J.L.Peterse, C.Roberts, M.J.Marton, M.Parrish, D.Atsma, A.Witteveen, A.Glas, L.Delahaye, d.van, V, H.Bartelink, S.Rodenhuis, E.T.Rutgers, S.H.Friend, and R.Bernards. 2002. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 347:1999-2009.
- Venter, D.J., N.L.Tuzi, S.Kumar, and W.J.Gullick. 1987. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 2:69-72.
- Vogel, C.L., M.A.Cobleigh, D.Tripathy, J.C.Gutheil, L.N.Harris, L.Fehrenbacher, D.J.Slamon, M.Murphy, W.F.Novotny, M.Burchmore, S.Shak, and S.J.Stewart. 2001. First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* 61 Suppl 2:37-42.
- Vogel, C.L., M.A.Cobleigh, D.Tripathy, J.C.Gutheil, L.N.Harris, L.Fehrenbacher, D.J.Slamon, M.Murphy, W.F.Novotny, M.Burchmore, S.Shak, S.J.Stewart, and M.Press. 2002a. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 20:719-726.
- Vogel, C.L., M.A.Cobleigh, D.Tripathy, J.C.Gutheil, L.N.Harris, L.Fehrenbacher, D.J.Slamon, M.Murphy, W.F.Novotny, M.Burchmore, S.Shak, S.J.Stewart, and M.Press. 2002b. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 20:719-726.

Wang, L.H. 2004. Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt. Sinai J. Med.* 71:361-367.

Wang, M.S., Y.Pan, N.Liu, C.Guo, L.Hong, and D.Fan. 2005a. Overexpression of DARPP-32 in colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Clin. Pract.* 59:58-61.

Wang, Y., J.G.Klijn, Y.Zhang, A.M.Sieuwerts, M.P.Look, F.Yang, D.Talantov, M.Timmermans, M.E.Meijer-van Gelder, J.Yu, T.Jatkoe, E.M.Berns, D.Atkins, and J.A.Foekens. 2005b. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365:671-679.

Weaver, V.M., S.Lelievre, J.N.Lakins, M.A.Chrenek, J.C.Jones, F.Giancotti, Z.Werb, and M.J.Bissell. 2002. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2:205-216.

Wen, X.F., G.Yang, W.Mao, A.Thornton, J.Liu, R.C.Bast, Jr., and X.F.Le. 2006. HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy. *Oncogene* 25:6986-6996.

Wieduwilt, M.J. and M.M.Moasser. 2008. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol. Life Sci.* 65:1566-1584.

Wood, L.D., D.W.Parsons, S.Jones, J.Lin, T.Sjoblom, R.J.Leary, D.Shen, S.M.Boca, T.Barber, J.Ptak, N.Silliman, S.Szabo, Z.Dezso, V.Ustyanksky, T.Nikolskaya, Y.Nikolsky, R.Karchin, P.A.Wilson, J.S.Kaminker, Z.Zhang, R.Croshaw, J.Willis, D.Dawson, M.Shipitsin, J.K.Willson, S.Sukumar, K.Polyak, B.H.Park, C.L.Pethiyagoda, P.V.Pant, D.G.Ballinger, A.B.Sparks, J.Hartigan, D.R.Smith, E.Suh, N.Papadopoulos, P.Buckhaults, S.D.Markowitz, G.Parmigiani, K.W.Kinzler, V.E.Velculescu, and B.Vogelstein. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318:1108-1113.

Woodhouse, E.C., R.F.Chuaqui, and L.A.Liotta. 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80:1529-1537.

Worthylake, R., L.K.Opresko, and H.S.Wiley. 1999. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 274:8865-8874.

Wyckoff, J.B., J.G.Jones, J.S.Condeelis, and J.E.Segall. 2000. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res.* 60:2504-2511.

Xia, W., L.H.Liu, P.Ho, and N.L.Spector. 2004. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* 23:646-653.

Yakes, F.M., W.Chinratanalab, C.A.Ritter, W.King, S.Seelig, and C.L.Arteaga. 2002. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.* 62:4132-4141.

Yarden, Y. and M.X.Sliwkowski. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137.

Zhang, W., J.E.Dahlberg, and W.Tam. 2007. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am. J. Pathol.* 171:728-738.

Zhang, W., B.Razani, Y.Altshuler, B.Bouzahzah, K.E.Mostov, R.G.Pestell, and M.P.Lisanti. 2000. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 275:20717-20725.

8 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
[D]-PDMP	D-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
A	Adenin
Abb	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADP	Adenosin-diphosphat
Ang-1	angiopoietin-1
AR	amphiregulin
ATCC	American Type Tissue Culture Collection
ATP	Adenosin-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BTC	betacellulin
C	Cytosin
ca	circa
Cdk2	cyclin dependent kinase 2
c-erbB	cellular avian erythroblastic leukemia oncogene homolog
cp	crossing point
CT-B	Choleratoxin-B
d	Tag, engl. day
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DARPP-32	dopamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EHS-Tumor	Engelbreth-Holm-Swarm Tumor
EPR	epiregulin
ERK	extracellular regulated kinase
EtOH	Ethanol absolut
FDA	food and drug administration
FGF	fibroblast growth factor
FKS	fötales Kälberserum
fw	forward
g	Gramm
G	Guanin
GAB	Grb2-associated binding protein
GM1	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4(NeuAc α 2 \rightarrow 3)Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GM3	NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
Grb2	growth factor receptor bound protein 2

h	Stunde
HB-EGF	heparinbinding EGF
HCl	Hydrogenchlorid
HER	human epidermal growth factor receptor
HG	human genome
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HR	Herceptin resistant
HRP	Meerrettich-Peroxidase, engl. horse-radish peroxidase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IF	Immunofluoreszenz
IGF-1 R	insulin like growth factor 1 receptor
IgG	Immunglobulin G
IPA	ingenuity pathway analysis
k	Kilo
K	Kontrolle
KAl(SO ₄) ₂	Aluminiumkaliumsulfat
L	Liter
L-Glu	L-Glutamin
m	Milli
M	molar (mol/L)
MAPK	miogeno activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MEM	minimum essential medium
MES	(N-morpholino)ethanesulfonic acid
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MUC-4	Mucin-4
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	non-essential aminoacids
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NP-40	Nonidet-P40
NRG	neuregulin
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
P	Phospho-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAK	p21-activated kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDK	Phosphatidylinositol-dependent kinase
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)
PKB	Protein-Kinase B (Akt)
PLC-PKC	phospholipase C-proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PolyHEMA	Poly2-hdroxyethyl methylacrylat
PTEN	Phosphatase tensin homologue
Ras	rat sarcoma viral oncogene homolog
RB	retinoblastoma
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. rounds per minute
RPMI	Akronym, hergeleitet von Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
Ser	Serin
SH2	src-homology 2
Shc	src homology 2 domain-containing-adaptor protein
shRNA	small hairpin
siRNA	small interfering RNA
SOS	son of sevenless protein homolog
T	Thymin
t-	truncated-
Tab	Tabelle
TAF	tumorassoziierter Fibroblast
TBS	tris-buffered saline
TBS-T	TBS + Tween20
TGF α	transforming growth factor α
TGF- β	transforming growth factor - β
Thr	Threonin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNF α	tumor necrosis factor α
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3 propandiol
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
V	Volt
V	Valin (Einbuchstabencode für Aminosäuren)
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin (Einbuchstabencode für Aminosäuren)

Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Carola Ries für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe bedanken. Ihre großzügige Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung vielfältiger Arbeitsmittel haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mit ihrer Begeisterung für die Wissenschaft, ihrem umfangreichen Wissen und ihrer unverwechselbaren Art was sie mir stets ein großes Vorbild.

Bei Dr. Angelika Böttger bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens, ihr Interesse an dieser Arbeit und für ihre Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Elisabeth Weiss für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen lieben Dank an meine Laborkollegen/innen Sandra Bunte, Barbara Threm, Alexandra Baumgartner, Flora Rey-Giraud und Meher Majety für die schöne gemeinsame Zeit und die gute Stimmung im „Ries“-Lab. Mein Dank gilt auch Wilma Höcherl für die ausgezeichnete Versorgung mit Labormaterialien und ihre Hilfsbereitschaft. Daniela Angenendt möchte ich danken für die angenehme Zusammenarbeit während ihrer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe. Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Andrea Ivascu für den großzügigen Ideen-, Reagenzien- und Protokollaustausch bedanken. Danke für die schöne Zeit auch an Erika Herzmann, Claudia Kirstenpfad und Wolfgang Weckwarth und an all die anderen Kollegen/innen von Ebene fünf.

Ute Bär, Helmut Burtscher, Petra Grämmel, Heike Seul und Olaf Mundigl für ihre Unterstützung und Expertise bei den Genexpressionsanalysen, der Klonierung, der konfokalen Mikroskopie und der Aufarbeitung humaner Tumorproben. Prof. Manfred Kubbies, Max Hasmann und Stefan Ries danke ich von Herzen für ihre anhaltende Diskussionsbereitschaft und Anregungen, die diese Arbeit bereichert haben.

Prof. Stefan Jentsch und Dr. Olaf Stemmann danke ich für die Bereitstellung der Ultrazentrifuge in deren Arbeitsgruppe am MPI für Biochemie in Martinsried.

Schließlich und am Allermeisten möchte ich mich bei meinen lieben Eltern bedanken. Dafür, dass sie immer für mich da waren. Herzlichen Dank auch an meine guten Freunde für ihre Unterstützung und die immer offenen Ohren und Haustüren.

Lebenslauf

Name: Marlene Pickl
Geburtsdatum: 08. Oktober 1978
Geburtsort: Neumarkt i.d. Opf.

Schulbildung

1984 –1989	Grundschule Möning
1989 –1991	Hauptschule Freystadt
1991 –1994	Realschule in Neumarkt i. d. Opf.
Abschluss	Mittlere Reife
1998 –1999	Berufsoberschule in Neumarkt i. d. Opf. / 12. Klasse
Abschluss	Fachhochschulreife
1999 –2000	Berufsoberschule in Nürnberg / 13. Klasse
Abschluss	Allg. Hochschulreife

Berufsausbildung

1994 –1997	Ausbildung zur Chemielaborantin bei der Firma Novartis (vormals Sandoz AG) in Nürnberg und Besuch der Berufsschule in Nürnberg
Berufsabschluss	Chemielaborantin

berufliche Tätigkeit

1997 –1998	bei der Firma Novartis in Nürnberg, Abteilung Qualitätssicherung
------------	---

Studium

2000 –2005	Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth
Abschluss	Diplom Biochemikerin univ. Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, Arbeitsgruppe Prof. Dr. L. Hengst <u>Thema:</u> Die Rolle der Tyrosinphosphorylierung bei dem Cdk- Inhibitor p21Waf1/Cip1

Promotion

2005-2009

Promotion bei der Firma Roche Diagnostics GmbH
in Penzberg, Abteilung Onkologie/Zellbiologie

Thema: Charakterisierung des HER2 Signalwegs im Vergleich von
2D- und 3D-Zellkultur und in einer Trastuzumab resistenten
SKBR-3 Zelllinie